

SÉRIE A, N° 909

N° D'ORDRE :

933

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention Sciences)

PAR

Nur Mohammad SHEIKH

1^{re} THÈSE

INFLUENCE DES PRODUITS DE LA RÉACTION DE MAILLARD
SUR LA FERMENTATION ALCOOLIQUE
ET LE DÉVELOPPEMENT DE LA LEVURE

2^e THÈSE

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 18 juin 1960 devant la Commission d'examen :

MM. CHOUARD ²Président.

CAMUS

LEMÉE

} Examinateurs.

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

1960



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553814_0050

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention Sciences)

PAR

Nur Mohammad SHEIKH

1^{re} THÈSE

**INFLUENCE DES PRODUITS DE LA RÉACTION DE MAILLARD
SUR LA FERMENTATION ALCOLIQUE
ET LE DÉVELOPPEMENT DE LA LEVURE**

2^e THÈSE

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 18 juin 1960 devant la Commission d'examen :

MM. CHOUARD *Président.*

CAMUS

LEMÉE

} *Examineurs.*

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
DE BROGLIE	T	Théories physiques.
PRENANT	T	Anatomie et histol. comparées.
PÉRÈS	T	Mécanique des fluides et applications.
BARRABÉ	T	Géologie struct. et Géologie appliquée.
BOURCART	T	Géogr. physique et Géol. dynamique.
PLANTEFOL	T	Botanique.
GRASSÉ	T	Évolution des êtres organisés.
PRÉVOST	T	Chimie organique.
BOULIGAND	T	Application de l'analyse à la Géométrie.
CHAUDRON	T	Chimie appliquée.
WYART	T	Minéralogie.
TEISSIER	T	Zoologie.
MANGENOT	T	Biologie végétale.
P. AUGER	T	Physique quantique et relativité.
MONNIER	T	Physiologie générale.
PIVETEAU	T	Paléontologie.
ROCART	T	Physique (E. N. S.).
H. CARTAN	T	Mathématiques (E. N. S.).
LAFFITTE	T	Chimie Générale.
FAVARD	T	Géométrie supérieure.
COULOMB	T	Physique du Glob.
M ^{lle} COUSIN	T	Biologie animale (S. P. C. N.).
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.
P. DRACH	T	Zoologie.
KASTLER	T	Physique (E. N. S.).
EPHRUSSI	T	Génétique.
WURMSER	T	Biologie physico-chimique.
RIVIÈRE	T	Géologie (S. P. C. N.) Orsay.
GAUTHERET	T	Biol. Végétale (P. C. B.).
LUCAS	T	Recherches Physiques.
A. THOMAS	T	Biol. cellulaire.
ARNULF	T	Optique appliquée.
M. MORAND	T	Enseignement de Physique.
SOLEILLET	T	Physique (P. C. B.).
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides.
DANJON	T	Astronomie.
PETIT	T	Biologie maritime.
QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique.
GALLIEN	T	Embryologie.
EICHHORN	T	Biologie végétale (S. P. C. N.).
DE CUGNACT	T	Biologie Végétale (S. P. C. N.).
M ^{lle} CAUCHOIS	T	Chimie Physique.
THELLIER	T	Physique du Globe.
L'HÉRITIER	T	Génétique.
GRIVET	T	Radioélectricité.
PONCIN	T	Mécanique générale.
DUBREIL	T	Arithmétique et théorie des nombres.
QUELET	T	Chimie organique.
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
CHAMPETIER	T	Chimie macromolécul.
CUVILLIER	T	Micropaléontologie.
JUNG	T	Pétrographie.
TRILLAT	T	Microscopie et diffract. électronique.
WIEMANN	T	Chimie organique et structurale.
JACQUINOT	T	Spectroscopie et physique céleste.
VASSY	T	Physique de l'atmosphère.
DESTOUCHES	T	Théories physiques.
PRUVOST	T	Géologie.
AMIEL	T	Chimie générale.
HOCART	T	Minéralogie.
J. P. MATHIEU	T	Physique (Orsay).
COUTEAUX	T	Biol. animale (P. C. B.).
MAY	T	Zoologie (Orsay).
CHOUQUET	T	Théor. des fonctions et Topologie.
FELDMANN	T	Biol. végétale marine.

Doyen..... J. PÉRÈS

GUINIER	T	Physique des Solides.
JOST	T	Physiologie comparée.
FORTET	T	Calcul des prob. et physique mathématique.
SCHWARTZ	T	Calc. diff. et Intégr.
CHOUARD	T	Physiologie végétale.
MALAVARD	T	Aviation.
BRELOT	T	Calcul différentiel.
NORMANT	T	Synthèse organique.
BENARD	T	Chimie minérale.
BUVAT	T	Botanique (E. N. S.).
DUGUÉ	T	Statistiques mathém.
GÉLOSO	T	Chimie (S. P. C. N.).
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.
ULRICH	T	Physiologie végétale.
MARÉCHAL	T	Optique théorique et appliquée.
KIRRMANN	T	Théories chimiques.
CHADEFAUD	T	Botanique.
M ^{lle} LE BRETON	T	Physiol. générale.
SALEM	T	Mathématiques générales
LELONG	T	Mathématiques générales.
DEVILLERS	T	Anatomie et Histol. comparées.
EHRESMANN	T	Topologie algébrique.
FRANÇON	T	Physique (S. P. C. N.).
GLANGEAUD	T	Géogr. physique et Géologie dynamique.
GODEMENT	T	Mathématiques (M. G. P.).
PISOT	T	Techniques mathem. de la Physique.
ROCH E.	T	Géologie.
SCHATZMANN	T	Astrophysique.
TERMIER	T	Paléontologie stratigraphique
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales.
LENNUYER	T	Physique (M. G. P.).
RIZET	T	Génétique.
ROUTHIER	T	Géologie appliquée.
M ^{me} TONNELAT	T	Relativité.
DIXMIER	T	Mathématiques (M. P. C.).
SOUCHAY	T	Chimie générale.
AIGRAIN	T	Électrotechn. générale.
BRUSSET	T	Chimie minérale.
M. LEVY	T	Physique théorique des hautes énergies.
M ^{me} CHAIX	T	Chimie biologique.
M ^{me} HUREL-PY	T	Biol. v.g. (P. C. B.).
PIAUX	T	Chimie (P. M. C.).
BRUN	T	Mécanique exper. des Fluides.
LEDERER	T	Chimie biologique.
M ^{me} DUBREIL	T	Mathématiques.
M ^{me} LELONG	T	Mathem. (E. M. S.).
BELLAIR	T	Géologie (S. P. C. N.).
COTTE	T	Physique (Orsay).
DUBOIS J. E.	T	Chimie organique.
LAMOTTE	T	Zoologie (E. N. S.).
MICHEL André	T	Chimie (S. P. C. N.).
OLMER	T	Energétique Gle.
ROCAULT	T	Physique générale.
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée.
BACHEWITZ	T	Chimie Physique.
BROSSEL	T	Physique atomique.
BUSER	T	Physiologie comparée.
GAMUS	T	Physiol. Vég. (3 ^e Cycle).
GASTAING	T	Physique générale.
GURIEN	T	Minéralogie et cristallographie.
MOYSE	T	Physiol. Vég. (Orsay).
PANNETIER	T	Chimie (S. P. C. N.).
POSSOMPES	T	Zoologie.
PULLMANN	T	Chimie théorique.
TEILLAC	T	Physique nucléaire et radio-activité.
TONNELAT	T	Biol. physicochimique.
VILLE	T	Econométrie.
WILLEMART	T	Chimie (P. C. B.).
DODÉ	T	Chimie (S. P. C. N.) Orsay.
FREYMANN	T	Physique générale.
GUINOCHE	T	Biol. Vég. (Orsay).



ROLLET	T	Chimie (P. C. B.).	CHATELET	T	Chimie (S. P. C. N.).
M ^{lle} JOSIEN.....	T	Chimie (P. C. B.).	JEAN	T	Physique Nucléaire et Radio- activité.
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théo- rie des groupes.	MATTLER	T	Physique (S. P. C. N.).
ARNOULT	T	Électronique.	MICHEL (Louis) ..	T	Physique théorique des hautes énergies.
CHAPELLE	T	Physique (M. P. C.) (Orsay).	RUMPF	T	Chimie (P. C. B.).
DELANGE	T	Mathématiques (Orsay).	BERGERARD	T	Zoologie (Orsay).
DENY	T	Mathématiques (M. G. P.).	BERTEIN	T	Electronique.
GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides.	BOUSSIÈRES	T	Chimie des Radioéléments.
LUCAS G.	T	Géologie.	M ^{me} COUTURE ...	T	Physique (P. C. B.).
ALLARD	T	Chimie Physique.	ELLENBERGER ...	T	Géologie Structurale et Géo- logie appliquée.
BERTHELOT	T	Physique Nucléaire et Radio- activité.	FRANC	T	Biologie animale.
BRICARD	T	Météorologie et Physique de l'Atmosphère.	SCHNELL.....	T	Botanique tropicale.
M ^{me} ALBE-FES-			STOLKOWSKI	T	Physiologie générale.
SARD	T	Psychophysiol.	ACHER	T	Chimie Biologique (Orsay).
FRIEDEL	T	Physique des Solides.	BAUDOUIN	T	Biologie animale (P. C. B.).
M. JULIA	T	Étude des molécules orga- niques complexes.	BEAUMONT	T	Biologie animale (S. P. C. N.)
LENDER	T	Biol. Animale. (S. P. C. N.) (Orsay).	BLAMONT	T	Géophysique Ionosphère.
MAGAT	T	Physico-chimie des Rayonne- ments.	BOURREAU	T	Biologie Végétale S. P. C. N. (Orsay).
M ^{lle} QUINTIN	T	Électrochimie.	CURIE	T	Physique (M. G. P.).
MONOD	T	Chimie du métabolisme.	DURAND-DELGA ..	T	Géologie.
BENOIT	T	Physiologie animale.	FRÉON	T	Chimie (P. C. B.).
DE POSSEL	T	Analyse numérique.	HELLER	T	Physiologie végétale.
CHARLOT	T	Chimie analytique.	TORTRAT	T	Calcul des Probabilités.
HAISSINSKY	T	Radiochimie.	GAILLEUX	T	Géologie (S. P. C. N.).
LEMEE	T	Physiologie B. M. P. V.	MAGNAN	T	Physique (M. P. C.).
GUÉRIN	T	Chimie M. P. C.	DAUDEL	T	Mécanique Ondulatoire appli- quée à la chimie théorique et à la Physique Nucléaire.
			M ^{lle} FOURCHOY ..	T	Biologie Végétale (S. P. C. N.)

Secrétaire général C. MONIER

**INFLUENCE DES PRODUITS DE LA RÉACTION DE MAILLARD
SUR LA FERMENTATION ALCOOLIQUE
ET LE DÉVELOPPEMENT DE LA LEVURE**

SOMMAIRE

I. — INTRODUCTION.	13
1 ^o Généralités sur la réaction de Maillard	13
2 ^o Plan du travail exposé.	15
II. — TECHNIQUES ET MÉTHODES ANALYTIQUES	17
1 ^o Préparation des mélanoidines.	17
2 ^o Fermentations et cultures.	17
A. — Levure.	17
B. — Milieux de base.	17
C. — Appareils et modes opératoires.	18
3 ^o Méthodes de dosages.	19
III. — RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.	21
<i>Première partie</i> : Fermentations.	21
1 ^o Examen général de l'action de différentes mélanoidines	21
A. — Mélanoidines de glucose et de glyco-colle.	22
1 ^o Composition des mélanoides.	22
2 ^o Résultats de la fermentation.	22
a) gaz carbonique dégagé.	22
b) levure formée.	23
c) évolution des trois formes d'azote.	23
d) alcools.	24
e) acides.	24
f) glycérol, 2-3 butanediol, acétoïne	24
g) diacétyle, acétone	25
B. — Mélanoidines de glucose et d'alpha-alanine : même plan qu'en A... ..	25
C. — Mélanoidines de glucose et d'asparagine : même plan qu'en A.	28
D. — Mélanoidines de glucose et de glutamate de sodium : même plan qu'en A.	31
E. — Discussion.	34
2 ^o Étude particulière du dégagement de gaz carbonique	35
1 ^o Influence de la concentration sur l'activité des mélanoidines	36
2 ^o Influence du temps de fermentation	39
3 ^o Fractionnement des mélanoidines et localisation de l'activité	41
A. — Extraction aux solvants	41
B. — Chromatographie.	42
C. — Précipitation.	42
<i>Deuxième partie</i> : Culture en aérobiose	46
IV. — CONCLUSION GÉNÉRALE	48
BIBLIOGRAPHIE.	49

AVANT-PROPOS

En ce qui concerne mes travaux de Thèse, je formule ici ma profonde gratitude à l'égard de M. Léon PETIT, Docteur ès-Sciences, Maître de Recherches à l'Institut National de la Recherche Agronomique, à Paris, pour sa précieuse direction et ses conseils avisés. Sans relâche, il m'a orienté au cours de discussions, critiquant les résultats, suggérant des essais nouveaux.

Ma reconnaissance respectueuse va à M. le Professeur P. CHOUARD qui a accepté de prendre la responsabilité de ce travail et qui m'a constamment soutenu de sa bienveillante sollicitude.

Mes remerciements sincères vont à M. le Professeur CAMUS et à M. le Professeur LEMEE qui ont bien voulu faire partie du Jury.

Un autre témoignage de reconnaissance s'adresse à M. A. GUILBOT, Directeur du Laboratoire de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales et de leurs dérivés, pour m'avoir accueilli dans son Laboratoire, et à l'Institut National de la Recherche Agronomique pour les facilités de travail qu'il m'a accordées.

Je remercie vivement M^{lle} J. OOGHE, M^{me} J. POISSON, M. B. GODON, M^{me} J. BARBIER et tout le personnel du Laboratoire, de leur aimable collaboration.

Mes remerciements vont particulièrement à M. DUPUY, chargé de Recherches à l'Institut National de la Recherche Agronomique, qui a bien voulu critiquer mon travail, me suggérer certains développements et m'en faciliter la réalisation.

Il me serait difficile de ne pas m'acquitter ici d'une dette de reconnaissance envers le Docteur QUATRAT-i-KHUDA, D. Sc. (Londres), Directeur des Laboratoires de la Région Est du Pakistan Council of Scientific and Industrial Research, à Dacca (Pakistan). Il m'a toujours encouragé dans mon travail, et, sans son intervention, il ne m'aurait jamais été possible de réaliser ces recherches en France et de les poursuivre au-delà du temps fixé.

Je n'oublie pas de remercier le gouvernement français de l'aide matérielle qui m'a permis d'effectuer ces travaux de Thèse ; que M^{me} VIAUD, Chef du Bureau des Bourses au Ministère des Affaires Étrangères, trouve dans ces lignes l'expression de ma reconnaissance.

Je remercie personnellement son Excellence l'Ambassadeur du Pakistan en France, du soutien qu'il a bien voulu me donner au cours de mon séjour, et mes remerciements vont également au Conseil de la Recherche Scientifique et Industrielle du Pakistan et au gouvernement pakistanais, grâce auxquels j'ai pu profiter des facilités qui m'étaient accordées.

I. — INTRODUCTION

1^o GÉNÉRALITÉS SUR LA RÉACTION DE MAILLARD :

Le nom de MAILLARD est resté attaché aux réactions entre sucres et aminoacides qu'il a décrites en 1912 (1) : lorsqu'on chauffe un mélange de sucres réducteurs et d'acides aminés en solution, on voit se développer une coloration brune qui va en s'intensifiant ; à un certain stade de la réaction, du gaz carbonique se dégage ; si le chauffage est poursuivi pendant un temps suffisant, on voit franchement précipiter un pigment noir, qui a reçu le nom de Mélanoidines.

Par la suite, il est apparu manifeste que les réactions entre sucres et protéines se rattachaient au même type de réaction, et, actuellement, le nom de « réaction de MAILLARD » est étendu en fait aux réactions glucides-protéides qui interviennent à l'état sec ou en solution, à température ambiante ou à chaud, et qui se manifestent par l'apparition d'un brunissement, sans intervention de processus enzymatique. Dans ces conditions, il apparaît donc que la réaction de MAILLARD est d'une très grande généralité, étant susceptible de se produire dans la plupart des milieux biologiques en les modifiant dans leur aspect, leur constitution et leurs propriétés chimiques et biologiques. Aussi a-t-elle fait l'objet de nombreux travaux, dont la plupart d'ailleurs ont trait à l'étude du mécanisme de la réaction, un nombre relativement très restreint se préoccupant des propriétés physiologiques des produits qui en dérivent.

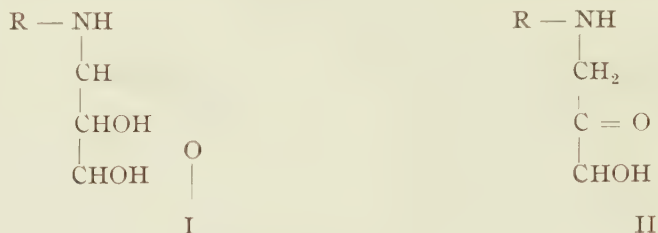
L'essentiel de nos connaissances sur la chimie de la réaction de MAILLARD se trouve rassemblé dans quelques revues bibliographiques : ENDERS (2), en 1938 ; DANEHY et PIGMAN (3), en 1951 ; HODGE (4), en 1953 enfin, ELLIS (5), en 1959.

Un certain nombre de travaux ont eu pour but de préciser les conditions de la réaction : nature des glucides et des protéines en présence, influence de leurs concentrations, du temps et de la température de chauffage ou des conditions physico-chimiques comme pH ou rH. Les caractères de la réaction ont également été précisés : outre le brunissement et le dégagement de gaz carbonique, la formation de mélanoidines s'accompagne d'une acidification, de l'apparition d'un pouvoir réducteur, d'une forte absorption dans l'ultra-violet et d'un développement de fluorescence.

D'autres études ont visé à élucider le déroulement de la réaction en identifiant les produits intermédiaires entre les molécules initiales et les pigments terminaux. Il apparaît que cette chaîne de réactions est certainement longue et compliquée : par chromatographie sur papier d'une préparation de mélanoidines obtenues par chauffage de glucose et de glycocolle marqués par C_{14} , CHICHESTER et ses collaborateurs (6) séparent plus de 24 composés différents, caractérisés par leur R_f , leur radioactivité éventuelle, leur réaction à la ninhydrine et à la paraphénylène-diamine ainsi que par leur fluorescence en lumière ultra-violette. Dans la revue bibliographique citée plus haut, HODGE propose de diviser en trois étapes principales cette réaction complexe :

1^o Dans un premier temps, molécule de sucre et molécule d'acide aminé se condensent avec élimination d'une molécule d'eau, les deux groupements réagissant étant la fonction aldéhydique d'une part, la fonction amine d'autre part. On obtient

ainsi une glycosylanine N-substituée (I) dont on a montré qu'elle s'isomérisait en 1-amino, 1-déoxy, 2-cétose (II) par réarrangement de AMADORI.



Les produits ainsi obtenus sont toujours incolores et dépourvus d'absorption ultra-violette.

2° Dans un deuxième stade, les molécules de sucre et d'amino-acides subissent des dégradations profondes. En particulier, la molécule de sucre est déshydratée ou coupée en chaînes carbonées plus courtes. C'est alors qu'apparaissent les dérivés furfuryliques, les réductones et les petites molécules comme l'acétol, le méthylglyoxal, le diacétyl, les aldéhydes glycolique et glycérique signalés par différents auteurs. De son côté, la molécule aminée, réagissant sur les composés dicarbonylés, subit entre autres la dégradation de STRECKER au cours de laquelle se dégage l'anhydride carbonique et prend naissance un aldéhyde possédant un carbone de moins que la molécule initiale d'acide aminé. Notre connaissance de cette étape de la réaction est très certainement incomplète et d'autres corps que ceux mentionnés ci-dessus s'y forment sûrement. Les composés formés à ce niveau sont caractérisés par une absorption ultra-violette due à la fois aux fonctions carbonylées et à la non-saturation des liaisons. Ils sont incolores ou très légèrement colorés dans le visible.

3° Enfin, dans une troisième phase, une suite de condensations entre groupements carbonylés ou entre groupes carbonylés et groupes aminés aboutit à la formation d'abord de composés fluorescents, puis, des pigments bruns, par des processus largement hypothétiques, sinon inconnus.

En fait, les phases de la réaction chevauchent les unes sur les autres, et à un moment donné — sauf tout au début lorsque les pigments ne sont pas encore apparus ou en fin de réaction — les différents constituants coexistent mais dans des proportions qui dépendront des conditions où s'effectue la réaction. Or, ces conditions peuvent varier dans de très larges limites de température, de pH, de concentrations — du milieu simplement humide à la solution diluée. Par suite, la composition d'un milieu où s'est développée la réaction de MAILLARD peut être très variable et une étude sur l'influence de cette réaction dans un certain domaine doit comprendre une série d'essais destinés à explorer l'influence de ces divers paramètres.

Parmi les domaines où cette réaction peut intervenir, celui de la nutrition des êtres vivants est sans aucun doute important. Lorsqu'il s'agit d'alimentation humaine, l'aspect et le goût des produits jouent un rôle important et là, d'assez nombreux travaux ont été effectués, concernant les altérations de ces propriétés par suite du brunissement et les moyens de les pallier. Mais, en dehors de cet aspect technologique de la question, on peut se demander quelles sont les répercussions physiologiques de cette réaction et chercher à savoir dans quelle mesure le métabolisme peut se trouver affecté, soit par la dégradation progressive des formes glucidiques et azotées, soit par

l'apparition des corps nouveaux, plus ou moins bien connus, formés au cours de la réaction. Les recherches n'ont été que fort peu poussées dans ce sens et les travaux effectués se rapportent surtout à la nutrition des animaux supérieurs. En général les conclusions des essais « in vivo » aboutissent à la même conclusion : les mélanges de glucides et de protides chauffés ont une valeur nutritive inférieure à celle du même mélange non chauffé. Les essais de digestibilité « in vitro » par la pancréatine menés par CREMER et MENDEN (7) sur la caséine et le glucose montrent que la protéine après chauffage avec le sucre, est beaucoup plus résistante à l'hydrolyse enzymatique.

Dans le domaine qui nous a surtout préoccupés, celui de l'action des mélanoidines sur le développement d'un microorganisme, les travaux sont encore plus restreints. En 1909, DZIERZBICKI (8), étudie l'action sur la fermentation et la croissance de la levure, non des mélanoidines, mais des substances humiques extraites du sol, composés ayant une composition globale et des propriétés physico-chimiques voisines de celles des mélanoidines proprement dites. Il constate que ces substances ont un effet favorable sur les phénomènes observés, particulièrement lorsque la levure est en petites quantités, le milieu de culture étant constitué de glucose, d'acide aspartique et de sels minéraux.

Si l'on s'intéresse à d'autres microorganismes que la levure, on trouve encore quelques références relatives à l'influence du chauffage des milieux de culture sur la croissance ; ces milieux de culture contenant en général des sucres et des aminoacides ou peptides, ces travaux peuvent ainsi donner quelques indications sur l'action éventuelle des mélanoidines dans ce domaine. PETERSON et ses collaborateurs (9) montrent que les produits de la réaction de MAILLARD peuvent inhiber légèrement et passagèrement la croissance de *B. polymyxa*. ZABRODSKI (10), étudiant l'action des mélanoidines sur la microflore des « mashes », trouve une inhibition du développement des moisissures et des bactéries, qu'il attribue à l'acidification du milieu. Enfin, CHÉLDELIN et KING (11), dans un travail sur la nutrition des microorganismes montrent que le N-glucosyl-glycine (N-G-G-) premier stade de la réaction glucose-glycocolle est capable d'activer la croissance de *L. Gayoni*. Lorsque le N-glucosylglycine est chauffé avec le milieu de culture, la courbe de réponse de la croissance en fonction de la concentration du N-G-G passe par un maximum, indiquant ainsi la possibilité d'une inhibition aux fortes concentrations. Lorsque le N-G-G n'est pas chauffé au préalable, la courbe de réponse se termine par un palier. L'inhibition est donc provoquée par un produit de réaction du N-G-G avec le milieu de culture. Il s'agit là des expériences les plus nettes mettant en évidence les possibilités d'action des mélanoidines sur la croissance d'un microorganisme.

2° PLAN DU TRAVAIL EXPOSÉ :

Le présent travail se propose d'apporter une contribution à nos connaissances dans ce domaine dans le cas de la levure de boulangerie, *Saccharomyces Cerevisiae*. Ce microorganisme a été choisi pour différentes raisons : en premier lieu, il est appelé à se développer dans un milieu contenant normalement des mélanoidines, puisque les moûts industriels contiennent des mélasses de sucrerie. En outre, selon les conditions de culture — aérobiose ou anaérobiose — son métabolisme est orienté dans des sens très différents. Enfin, on sait que pour *Saccharomyces cerevisiae*, la forme sous laquelle l'azote est apporté présente une grande importance ; on pouvait donc espérer suivre

l'influence de la dégradation de l'azote au cours de la réaction de MAILLARD sur son assimilation.

Il comprend un examen étendu de l'action de différents types de mélanoidines sur la fermentation alcoolique et sur le développement aérobie de la levure. Par « mélanoidines », nous désignons, non pas les pigments insolubles, mais, suivant un usage généralisé, l'ensemble de la préparation où sucre et aminoacide ont réagi. Un tel milieu comprend donc les réactifs initiaux en excès et toute la gamme des produits intermédiaires de la synthèse des pigments. Ces corps intermédiaires sont certainement les plus réactifs du point de vue chimique et les plus intéressants du point de vue biologique. La réaction de MAILLARD a été effectuée à 90 °C, généralement en milieu 1 M en chacun des constituants initiaux ; quelques préparations ont cependant été effectuées en milieu plus concentré ou plus dilué. Les temps de chauffage ont été compris entre quelques heures et soixante heures, selon la réactivité des constituants mis en jeu. On a laissé le pH du milieu évoluer librement ; il s'est donc déplacé vers les valeurs acides au cours du déroulement de la réaction.

Nous n'avons étudié que les mélanoidines dérivées du glucose. Avec ce sucre, on a fait réagir 4 aminoacides, choisis en raison de leurs efficacités sensiblement différentes du point de vue source azotée. Avec le matériel préparé dans ces conditions, le travail suivant a été effectué :

a) *En anaérobiose*

1° Les mélanoidines ont été ajoutées à un milieu de culture complètement dépourvu de toute source azotée mais possédant par contre tous les autres éléments minéraux et organiques nécessaires à la levure. Ces essais ont été réalisés dans un fermentomètre construit au laboratoire. On a mesuré :

a — La vitesse de dégagement de l'anhydride carbonique et la quantité totale libérée.

b — Le poids de levure produit.

c — La quantité et la forme (aminée ou mélanoidine) de l'azote consommé.

d — La quantité et la nature des alcools formés.

e — La quantité globale d'acidité apparue.

f — La production de différents produits secondaires de la fermentation : glycérol, 2-3 butanediol et acétoïne.

g — L'évolution du diacétyl et de l'acétone préexistant en général dans les mélanoidines.

2° Une action nette sur la cinétique du dégagement de CO₂ ayant été observée au cours de ces essais systématiques, nous nous sommes efforcés de préciser la nature et l'origine de ces phénomènes. Ce travail a été effectué à partir d'une mélanoidine de glucose et de glycocolle ; cette préparation a été fractionnée par différentes techniques et on a tenté un début d'isolement des substances responsables de l'effet observé. Comme il s'agit là d'un effet cinétique, il a été possible d'utiliser la technique, plus précise, du micro-Warburg.

b) *En aérobie*

Les mêmes mélanoidines ont été utilisées dans des essais en aérobie destinés à mettre en évidence leur action sur la multiplication cellulaire. Le principe expéri-

mental est le même que celui suivi en fermentation : on compare, toutes choses égales d'ailleurs, la croissance de la levure dans des milieux contenant, d'une part, tous les éléments nécessaires à son développement sauf une source azotée, d'autre part, la mélanoidine étudiée ou l'acide aminé utilisé pour sa préparation.

II. — TECHNIQUES ET MÉTHODES ANALYTIQUES

1° PRÉPARATION DES MÉLANOÏDINES :

Les mélanoidines ont été généralement préparées à partir de solutions de glucose et de solutions d'acides aminés en utilisant des volumes égaux de chaque solution de molarité 2 M. 10 cc de chaque solution sont introduits dans un tube rodé et le mélange est chauffé à reflux à 90° pendant le temps nécessaire. Après refroidissement, la préparation de mélanoidine est ajustée à un volume de 50 cc et conservée au froid.

2° FERMENTATIONS ET CULTURES :

a) *Levure*

La suspension de levure utilisée pour effectuer les ensemencements a été préparée à partir d'une culture de *Saccharomyces Cerevisiae*, isolée d'un pain de levure commerciale et entretenue sur milieu solide.

La levure recueillie a été lavée à l'eau distillée et mise en suspension dans un volume tel que les 10 cc employés apportent environ 160 mg de levure sèche.

b) *Milieux de base*

Après avoir essayé des milieux de compositions diverses, nous avons finalement retenu le milieu de base préconisé par l'Association of Official Agricultural Chemists pour le dosage de la thiamine, par la méthode de fermentation, à cette modification, près que les sels d'ammonium ont été remplacés par des sels de potassium et que l'hydrolysate de caséine a été omis, la seule source d'azote devant être apportée par la préparation de mélanoidines. On prépare donc les solutions de compositions suivantes:

— Solution A :

PO ₄ HK ₂	95 g
PO ₄ H ₂ K.....	213 g
Vitamine PP.....	200 mg
Vitamine B6.....	4 mg

On amène à 1 000 cc

— Solution B :

Glucose anhydre.....	200 g
SO ₄ Mg 7H ₂ O.....	7
PO ₄ H ₂ K.....	2,2
K Cl.....	1,7
Ca Cl ₂ 2H ₂ O.....	0,5
Fe Cl ₃ 6H ₂ O.....	0,01
Mn SO ₄ 4H ₂ O.....	0,01

On amène le volume à 1 000 cc. Les deux solutions sont autoclavées.

— Solution de thiamine : à 0,2 γ/cc.

c) *Appareils et modes opératoires*a) *Fermentation.*

Le vase à fermentation est un ballon de 250 cc à fond rond et col long, muni d'un diverticule d'environ 25 cc greffé sur le col. Ce récipient, plongé dans un thermostat, est relié à un manomètre à eau, à niveau variable, où sera recueilli le gaz carbonique dégagé et son volume lu à la pression atmosphérique et à température constante. La capacité maximum de ce manomètre est de 450 cc.

Le milieu de fermentation est réalisé par le mélange des solutions décrites ci-dessus qui donne et maintient un pH de 6,00.

Solution A	2,5 cc.
Solution B	7,5 "
Solution de Thiamine.....	10 cc.

auquel on ajoute :

— soit la mélanoidine étudiée (5 cc) et un volume convenable (v cc) de solution 0,4 M de glucose, tel que l'ensemble apporte 2 millimolécules de glucose,

— soit 5 cc d'un mélange de glucose et d'acide aminé 0,4 M en chaque composant, pour réaliser l'essai témoin.

Chaque solution est introduite dans le ballon à fermentation ; on ajoute (15-v) cc d'eau et on dépose 10 cc de la suspension de levure dans le diverticule. Après un séjour de 1 heure dans le thermostat à 30° C, le ballon est relié au manomètre, et, par renversement du ballon, on mélange levure et milieu de culture. A partir de ce moment, pris comme origine des temps, on relève de 15 minutes en 15 minutes, les quantités de gaz carbonique dégagé, le ballon étant agité mécaniquement. Les volumes recueillis sont connus avec une précision de ± 3 p. 100 environ. La quantité de levure et de glucose mis en jeu est telle que la fermentation est complète en 24 heures, le volume total de CO₂ étant alors de 400 cc.

Cet appareil et ce mode opératoire ont été utilisés au cours de l'examen systématique des différentes mélanoidines, de façon à obtenir des quantités suffisantes de jus complètement fermentés. Pour l'étude des activateurs et inhibiteurs de fermentation, on a employé la technique classique, plus précise et plus rapide, du micro-Warburg.

b) *Cultures en aérobiose.*

L'appareil utilisé est un flacon conique de 1 litre portant une plaque de verre fritté au sommet du cône qui constitue la base du récipient, contenant 100 cc de milieu de culture. A travers cette plaque poreuse, on insuffle de l'air sous pression, préalablement humidifié et filtré. Le débit d'air par minute est à peu près égal à 2 fois le volume de milieu de culture.

Celui-ci a la même composition que celui utilisé en fermentation. Toutefois, la solution B ne contenait pas de glucose : celui-ci a été ajouté séparément et en quantité telle que la somme du glucose apporté par la mélanoidine et de ce glucose ajouté soit constante.

Les 2 cc de suspension de levure utilisés pour l'ensemencement apportent 10 mg de substance sèche.

La quantité de levure formée a été mesurée par turbidimétrie à 550 m μ d'une dilution convenable en milieu alcalin effectué sur une prise d'échantillon, après centrifugation et lavage à fond.

3^o MÉTHODES DE DOSAGES :

Les mélanoidines étudiées et les milieux fermentés ont été analysés de façon à préciser leur constitution en composés les plus importants ou les plus significatifs.

Glucose.

De nombreux composés réducteurs étant formés au cours de la réaction de MAILLARD, il est préférable de séparer le glucose avant de le doser. Nous avons utilisé dans ce but l'action d'un échangeur de cations Dowex (D 50 $\times$ 8 50-100). 2 cc de la solution de mélanoidine sont versés sur une colonne de 50 cm de hauteur et 16 mm de diamètre remplie par cette résine mise sous forme acide. On rince à l'eau distillée et on recueille l'effluent par fraction de 5 cc jusqu'à passage d'un volume total de 80 cc, l'opération s'effectuant à la vitesse de 1 cc en deux minutes environ. On localise la position du glucose dans l'effluent par la réaction au phthalate acide d'aniline effectuée sur des gouttes de 20 μ l déposées sur papier ; en général, le glucose passe entre 35 et 60 cc. On recueille ces fractions, complète leur volume à 50 cc et dose le glucose par la méthode de SHAFFER-HARTMANN (12), avec une précision de $\pm 1, 5$ p. 100.

Après fermentation jusqu'à cessation du dégagement de gaz carbonique, la réaction au phthalate d'aniline sur les jus fermentés est négative et donc le glucose n'a pas été dosé.

Azote.

1^o *Azote total* : Il a été dosé par micro-Kjeldahl, après attaque sulfurique en présence de catalyseur au cuivre. On distille dans l'acide chlorhydrique 0,05 N et on titre en retour par une soude de même normalité. La quantité totale d'azote restant constante au cours de la formation des mélanoidines, ce dosage n'a été pratiqué que sur les milieux après fermentation.

2^o *Azote aminé* : La méthode la moins inexacte d'évaluation de l'acide aminé dans les mélanoidines consiste en un dosage après chromatographie sur papier. Celle-ci a été effectuée sur des prises d'échantillons de 10 μ l, apportant au maximum 15 γ d'acide aminé, avec un solvant monophasique composé de N-butanol, de pyridine et d'eau, dans les proportions de 15/50/20, en volumes. Au moins dans le cas d'une mélanoidine de glucose et de glycocolle, ce solvant permet de séparer du glycocolle le N-glycoside qui réagit aussi à la ninhydrine et peut donc perturber le dosage. Après évaporation du solvant, on dose à la ninhydrine selon la méthode de THOMPSON (13) comportant la révélation en atmosphère de gaz carbonique et d'alcool. Après élution des taches colorées dans l'alcool à 50 p. 100, on mesure les densités optiques à 570 $m\mu$. On trace une courbe étalon avec des solutions de titre connu en acide aminé, chromatographiées et traitées de façon identique. La précision globale est de l'ordre de ± 8 p. 100.

3^o *Azote dégradé* : ou azote des mélanoidines (N_M) : Nous appelons ainsi l'ensemble des formes azotées autres que l'acide aminé initial. Si N_T est la concentration moléculaire en azote total, soit calculé, dans le cas d'une mélanoidine, soit dosé, dans le cas d'un milieu de culture, et N_A la concentration en azote aminé dosé par la méthode précédente, on a par définition :

$$N_M = N_T - N_A$$

Étant donné l'imprécision de N_v et du fait que, fort peu d'acide étant détruit au cours de la réaction de MAILLARD, $N_T - N_A$ est en général faible, N_v n'est connu qu'avec une mauvaise approximation et seules des variations importantes ou systématiques pourront être prises en considération.

Alcools.

Les alcools sont fractionnés, selon la méthode de NEISH, (14) sur une colonne de célite 535 dont le développement est assuré par trois lavages successifs : tétrachlorure de carbone, mélange tétrachlorure-chloroforme, enfin chloroforme. On sépare ainsi et dans l'ordre :

N-butanol
isopropanol
éthanol.

Dans ces trois effluents, on dose l'alcool par oxydation sulfochromique, l'excès de réactif étant titré par iodométrie. L'erreur globale avoisine ± 6 p. 100.

Acides.

Les seuls acides dosés ont été les acides extractibles à l'éther. Sont donc compris dans ce dosage tous les acides provenant de la fermentation — les seuls intéressant ce travail — mais non tous les acides formés au cours de la réaction de MAILLARD.

Une prise d'essai contenant, dans un volume inférieur à 5 cc, de 0,5 à 1 milliéquivalent acide est extraite par l'éther dans un microextracteur pendant 24 heures, au bain marie à 60 °C et à une vitesse de 2 à 3 cc par minute. L'acidité est titrée par la soude 0,1 N en présence de rouge de phénol. La précision est de l'ordre de ± 2 p. 100.

Glycérol.

Certains auteurs ayant signalé la possibilité de formation de glycérol au cours de la réaction de MAILLARD, ce composé a été recherché dans nos préparations de mélanoidines. Pour ce faire, les mélanoidines ont été fractionnées par chromatographie sur papier avec le butanol saturé d'eau : on sépare ainsi glucose et glycérol. Les chromatogrammes ont été traités au métaperiodate de sodium, puis à l'acétate de benzidine. Aucune trace de glycérol n'a été mise en évidence.

Dans les solutions fermentées, le glycérol a été dosé par la méthode de NEISH : le formaldéhyde obtenu par oxydation périodique du glycérol donne avec l'acide chromotrope une réaction colorée dont l'intensité est mesurée à 570 m μ . L'excès d'acide périodique est au préalable détruit par action de l'arsénite de sodium. La reproductibilité des mesures est de l'ordre de ± 4 p. 100. On dose de 10 à 50 γ .

2-3 Butanediol.

Ce composé a lui aussi été dosé par l'intermédiaire de l'oxydation périodique au cours de laquelle se forme de l'acétaldéhyde. Cet aldéhyde réagit avec le nitroprussiate de sodium, en milieu rendu alcalin par addition de pipérazine, pour donner une coloration bleue. La coloration se développe progressivement, puis s'affaiblit. On suit son évolution à 570 m μ et on note le maximum atteint. La précision obtenue est de l'ordre de ± 4 p. 100 et la quantité dosée, de 400 γ maximum.

Acétoïne.

La méthode de WESTERFIELD (15) qui a été utilisée a pour base la réaction colorée obtenue lorsque l'on fait agir sur l'acétoïne un mélange de créatine et d' α -naphtol ; l'intensité de la coloration rouge obtenue est mesurée à 530 m μ . On dose ainsi un maximum de 15 γ avec une précision de ± 3 p. 100.

Diacétyle.

Le diacétyle a été dosé dans les mélanoidines et dans le milieu fermenté par la méthode de WHITE (16) qui consiste à former la diméthylglyoxime, par action de l'hydroxylamine, et à faire réagir celle-ci avec l'urée en milieu acide fort. Dans ces conditions, on obtient une coloration jaune, dont l'intensité est lue à 475 m μ . On peut doser jusqu'à 60 γ , avec une erreur de ± 2 p. 100.

Acétone.

La possibilité d'une formation d'acétone au cours de la réaction de MAILLARD ayant été signalée par certains auteurs, il était intéressant de doser ce composé et de suivre son évolution éventuelle au cours de la fermentation. Nous avons appliqué la réaction classique au salicylaldéhyde en milieu alcalin. La coloration rouge obtenue avec un maximum de 40 γ dans la prise, est mesurée à 530 m μ . La reproductibilité des mesures est de $\pm 1,5$ p. 100. En fait, l'exactitude du dosage est inférieure à cette valeur : on a constaté que le glucose était susceptible d'interférer.

Dans toutes ces différentes mesures colorimétriques, les corrections ont été faites relatives à l'absorption des réactifs et à l'absorption propre des mélanoidines.

III. — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

PREMIÈRE PARTIE

FERMENTATIONS

1. EXAMEN GÉNÉRAL DE L'ACTION DE DIFFÉRENTES MÉLANOIDINES

Nous présentons ici l'ensemble des résultats analytiques obtenus lorsqu'au milieu de base de fermentation décrit plus haut, on ajoute une même quantité de diverses préparations de mélanoidines. Celles-ci diffèrent entre elles, d'abord par la nature de l'acide aminé dont elles dérivent, ensuite, à l'intérieur de chacune de ces catégories, par l'intensité à laquelle la réaction a été poussée ; toutes choses égales d'ailleurs, cette intensité de réaction est proportionnelle au temps de chauffage. Dans l'impossibilité où nous nous trouvons de définir de façon précise et simple la composition d'une préparation de mélanoidines, c'est ce temps de chauffage — à 90 °C, dans tous les essais — qui est pris comme point de repère.

Pour chaque mélanoidine, nous indiquerons d'abord les quantités de glucose et d'acide aminé en excès à la fin de la réaction ; d'une part, ces grandeurs sont utiles à

la conduite des essais et au calcul des résultats ; d'autre part, elles permettent de préciser cette notion d'intensité de la réaction.

Ensuite, nous dressons les tableaux des résultats obtenus à partir de milieux de fermentation ; seul le dégagement de gaz carbonique a été observé pendant le développement de la fermentation ; les autres données sont relatives à des milieux complètement fermentés.

Nous avons étudié ainsi les mélanoidines dérivées du glyocolle, de l'alpha-alanine, de l'asparagine et du glutamate de sodium. Dans ce dernier cas, nous avons utilisé la forme du sel monosodique de façon à éviter la dégradation acide du glucose qui aurait entraîné la formation de grandes quantités de 5-hydroxymethylfurfural ; alors l'agent essentiel de la suite des réactions aurait été non le glucose mais ce 5 HMF extrêmement réactif vis-à-vis des groupes aminés et apte au brunissement spontané.

A — MÉLANOÏDINES DE GLUCOSE ET DE GLYCOLLE

1° Composition des mélanoidines :

TABLEAU I

(résultats exprimés en millimolécules par cc de solution utilisée pour les essais de fermentation).

	Mélanoidines de :							
	0	8	12	16	24	36	48	60 h.
Glucose.	0,4	0,33	0,29	0,28	0,24	0,21	0,17	0,16
N _A ⁰	0,4	0,34	0,31	0,30	0,29	0,26	0,25	0,22
N _M ⁰	0	0,06	0,09	0,10	0,11	0,14	0,15	0,18

(N_A⁰ = azote aminé ; N_M⁰ = azote dégradé = 0,4 — N_A⁰).

2° Résultats de la fermentation

a) Gaz carbonique dégagé en fonction du temps (résultats exprimés en cc)

TABLEAU 2

Temps de fermentation	Mélanoidines de :							
	0	8	12	16	24	36	48	60 h.
18 heures.	213	206	230	234	244	238	220	214
19 —	239	232	258	260	270	265	246	240
20 —	265	258	276	284	300	295	276	268
21 —	292	284	304	308	327	327	306	296
22 —	316	308	340	350	355	355	338	322
23 —	339	332	362	372	380	381	360	348
24 —	360	354	382	386	386	381	384	368
25 —	377	372	382	386	386	381	386	376
26 —	381	382	382	386	386	381	386	382

On constate que, sauf dans le cas de la mélanoidine de 8 heures, le dégagement de gaz carbonique se trouve accéléré par rapport au témoin, le volume total recueilli étant invariable.

b *Levure formée*

TABLEAU 3

Mélanoidines de :								
	0	8	12	16	24	36	48	60 h .
Poids récolté en mg ..	237	254	251	258	258	260	260	260
Accroissement p. 100..	48	59	57	61	61	62,5	62,5	62,5
$\text{Accroissement p. 100} = \frac{(\text{poids récolté (en mg)} - 160) \times 100}{160}$								

Quelle que soit la mélanoidine, le développement cellulaire est nettement amélioré par rapport au témoin.

c) *Évolution des trois formes d'azote*

TABLEAU 4

Mélanoidines de :								
	0	8	12	16	24	36	48	60 h .
N_T N_T^O	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
N_T N_T^R	0,33	0,31	0,29	0,33	0,34	0,31	0,33	0,32
ΔN_T	0,07	0,09	0,11	0,07	0,06	0,09	0,08	0,08
N_A N_A^O	0,4	0,34	0,31	0,30	0,29	0,26	0,26	0,22
N_A N_A^R	0,33	0,29	0,26	0,25	0,22	0,20	0,16	0,14
ΔN_A	0,07	0,05	0,05	0,05	0,07	0,06	0,09	0,08
N_M N_M^O	0	0,06	0,09	0,10	0,11	0,14	0,15	0,18
N_M N_M^R	0	0,02	0,03	0,08	0,12	0,11	0,17	0,18
ΔN_M	0	0,04	0,06	0,02	-0,01	0,03	-0,01	0

total (N_T), aminé (N_A) et dégradé ($N_M = N_T - N_A$). Tableau 4.

Nous rappelons dans ce tableau les valeurs N_T^O , N_A^O et N_M^O dosées ou calculées pour les mélanoidines.

Par différence entre ces valeurs et les quantités résiduelles obtenues après fermentation, on a les quantités ΔN_T , ΔN_A et ΔN_M , disparues au cours de la fermentation. (Les résultats sont exprimés en millimolécules par cc de mélanoidine initiale).

Il ressort de ce tableau que la consommation d'azote est faible : au maximum 20 p. 100 de l'azote présent. La consommation d'azote aminé est pratiquement constante, quelle que soit la mélanoidine utilisée. Pour les mélanoidines de 16 heures et plus, cette forme d'azote est pratiquement la seule utilisée par la levure.

Par contre, lorsque la réaction de MAILLARD est peu poussée, il semble qu'une

partie de l'azote dégradé puisse être assimilé ; la forme de cet azote est vraisemblablement assez proche de la forme aminée primitive.

d) *Alcools, exprimés en micromoles par cc de solution fermentée.*

TABLEAU 5

	Mélanoidines de :							
	0	8	12	16	24	36	48	60 h.
Ethanol	167	160	157	166	163	163	166	163
Propanols	10	2,6	2,3	4,8	4,8	4,8	10	10
Butanols	0	0	0	6,5	6,5	6,5	6,5	6, 5

Il ne semble pas que la présence de mélanoidine affecte sensiblement la production totale d'alcool éthylique ; peut-être peut-on noter une légère dépression en présence de mélanoidines de 8 à 12 heures. Cette variation est à peine significative, la précision de la méthode étant de l'ordre de 6 p. 100. Il ne paraît pas non plus que l'on puisse attacher une importance quantitative aux teneurs en propanols et butanol.

e) *Acides, exprimés en microéquivalents-acides par cc de la solution fermentée.*

TABLEAU 6

Acide	Mélanoidines de :							
	0	8	12	16	24	36	48	60 h.
Résiduels	16,2	13	13	13	15	13	13	10
Préformés	0	3	3	3	3	4	4	5
Différence	16,2	10	10	10	12	9	9	5

La décroissance observée ici est certainement significative en raison de la bonne précision du dosage et aussi en raison de sa continuité. On ne peut exclure que la correction apportée en soustrayant l'acidité initiale de la mélanoidine soit un peu forte, une partie au moins de ces acides pouvant être consommée par la levure. Mais cela ne change pas le sens du phénomène.

f) *Glycérol, 2-3 Butanediol, Acétoïne*

TABLEAU 7

(en micromoles par cc de solution fermentée).

	Mélanoidines de :							
	0	8	12	16	24	36	48	60 h.
Glycérol	2,2	2,99	2,8	2,4	2,9	2,1	3,1	2,9
2-3 Butanediol	0,7	0,8	1	0,9	0,8	0,8	0,5	0,4
Acétoïne	0,01	0,04	0,045	0,05	0,05	0,04	0,03	0,03

La production de glycérol est toujours un peu plus élevée en présence de mélanoidines; celle du 2-3 butanediol augmente, passe par un maximum et tombe enfin à une valeur inférieure à celle du témoin. L'amplitude de ces deux variations est de toutes façons faible. L'acétoïne dosée est pratiquement nulle; si donc la production de petites quantités de 2-3 butanediol s'effectue par réduction d'acétoïne cette réduction est totale.

g) *Diacétyl et acétone.*

TABLEAU 8

Ces deux composés préexistent dans les mélanoidines introduites dans le milieu; ils ne sont pas normalement produits par la levure en fermentation. Il était intéressant de voir dans quelle mesure elle était capable de les utiliser lorsqu'ils se trouvaient mis à sa disposition.

	Mélanoidine de :						
	8	12	16	24	36	48	60 h.
Diacétyl préformé	0,06	0,09	0,13	0,18	0,20	0,29	0,35
Diacétyl après fermentation ...	0,06	0,09	0,13	0,18	0,20	0,29	0,35
Différence.....	0	0	0	0	0	0	0
Acétone préformée	0,07	0,07	0,07	0,11	0,19	0,19	0,23
Acétone après fermentation ...	0,05	0,08	0,11	0,14	0,20	0,23	0,25
Différence	—0,02	0,01	0,04	0,03	0,01	0,04	0,02

Aucun des deux composés n'est utilisé par la levure. Il ne semble pas qu'il faille attacher une signification aux valeurs positives trouvées pour l'acétone; les écarts trouvés, bien que systématiquement positifs, sont de l'ordre des erreurs d'expérience dans un dosage qui, par ailleurs, n'est pas absolument spécifique.

En résumé, avec ce type de mélanoidines :

- 1° On note une nette accélération du dégagement de gaz carbonique;
- 2° on relève un accroissement sensible du poids de levure récoltée;
- 3° il semble que certaines formes peu dégradées de l'acide aminé soient susceptibles d'être utilisées par la levure;
- 4° on observe quelques légères déviations du métabolisme normal.

B — MÉLANOIDINES DE GLUCOSE ET D'ALPHA-ALANINE

L'alpha-alanine réagit intensément avec le glucose; aussi pour un temps de chauffage de 36 h et plus, la réaction est assez poussée pour que se forment les mélanoidines insolubles. Ces précipités ont été éliminés par filtration.

1° *Composition des mélanoidines*

TABLEAU 9

	Mélanoidines de :						
	0	8	16	24	36	48	60 h.
Glucose	0,40	0,36	0,35	0,33	0,29	0,27	0,25
N _A ^o	0,40	0,32	0,31	0,29	0,27	0,25	0,23
N _M ^o	0	0,08	0,09	0,11	0,13	0,15	0,17

2° Résultats de la fermentation

a) Gaz carbonique dégagé en fonction du temps.

TABLEAU IO

Temps de fermentation	Mélanoidine de :						
	0	8	16	24	36	48	60 h.
1 heure	24	22	21	20	27	24	24
2 heures.....	49	44	42	43	52	48	47
3 —	72	66	66	66	77	73	71
4 —	303	284	284	288	309	294	279
23 —	341	322	324	328	348	335	318
24 —	376	357	362	364	385	374	356
25 —	404	398	404	403	407	409	402
26 —	404	398	404	403	407	409	402

Seule la préparation de 36 heures a tendance à accélérer la fermentation ; les autres tendant plutôt à diminuer la vitesse de dégagement de CO_2 .

b) Poids de levure formée.

TABLEAU II

	Mélanoidines de :						
	0	8	16	24	36	48	60 h.
Poids récolté en mg	261	266	264	265	249	249	250
Accroissement p. 100	63	66	65	65,5	55	55	55

Jusqu'à 36 heures de préparation, on ne remarque aucune influence sur le poids de levure formée ; au-delà de 36 heures, net effet dépressif.

c) Évolution des 3 formes d'azote.

TABLEAU I2

	Mélanoidines de :						
	0	8	16	24	36	48	60 h.
N_T N_T^O	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
N_T N_T^H	0,23	0,27	0,27	0,25	0,26	0,27	0,26
ΔN_T	0,17	0,13	0,13	0,15	0,14	0,13	0,14
N_A N_A^O	0,40	0,31	0,30	0,29	0,27	0,25	0,23
N_A N_A^H	0,23	0,24	0,21	0,19	0,15	0,16	0,13
ΔN_A	0,17	0,07	0,09	0,10	0,12	0,09	0,10
N_M N_M^O	0	0,11	0,10	0,06	0,12	0,16	0,18
N_M N_M^H	0	0,03	0,06	0,06	0,11	0,11	0,12
ΔN_M	0	0,08	0,04	0	0,01	0,05	0,06

L'assimilation de l'azote total et de l'azote aminé est à peu près constante, quelle que soit la durée de chauffage subi par l'acide aminé. L'azote aminé paraît moins bien assimilé en présence de mélanoidines qu'il ne l'est chez le témoin. L'azote dégradé est, de façon générale, mal utilisé par la levure.

d) *Alcools.*

TABLEAU 13

	Mélanoidines de :						
	0	8	16	24	36	48	60 h.
Ethanol.....	150	155	148	149	150	150	150
Propanols.....	22,5	27,5	30	27,5	17,5	17,5	15
Butanols.....	0	0	0	0	0	0	0

La production d'éthanol est pratiquement inchangée ; celle de propanol est légèrement augmentée par les premières préparations et diminuée au-delà de 36 heures de chauffage.

e) *Acides.*

TABLEAU 14

	Mélanoidines de :						
	0	8	16	24	36	48	60 h.
Acides.....							
Résiduels.....	14,5	15,9	15	12	13	12	11
Préformés.....	0	4	6	6	6	7	7
Différence.....	14,5	11,9	9	6	7	5	4

La quantité d'acides accumulée dans le milieu décroît très notablement, en proportion du temps de chauffage de la mélanoidine.

f) *Glycérol, 2-3 Butanediol, Acétoïne.*

TABLEAU 15

	Mélanoidines de :						
	0	8	16	24	36	48	60 h.
Glycérol.....	3,4	6	5,3	5	5	5	4,9
2-3 Butanediol.....	1,3	1,4	1,5	1,6	1,7	1,7	1,7
Acétoïne.....	0,04	0,03	0,03	0,05	0,03	0,03	0,03

La production de glycérol est augmentée dans tous les cas ; celle de 2-3 butanediol également, mais dans de moindres proportions ; quant à l'acétoïne, la quantité dosée est très faible et sensiblement constante.

g) Diacétyle et Acétone.

TABLEAU 16

	Mélanoïdines de :					
	8	16	24	36 h.	48	60 h.
Diacétyle						
Préformé	0,05	0,13	0,20	0,23	0,28	0,26
Résiduel	0,08	0,19	0,23	0,33	0,38	0,37
Différence	0,03	0,06	0,03	0,10	0,10	0,11
Acétone						
Préformée	0,02	0,04	0,05	0,09	0,13	0,12
Résiduelle	0,08	0,10	0,13	0,16	0,17	0,17
Différence	0,06	0,06	0,12	0,07	0,04	0,05

Résumé.

Ces mélanoïdines, dérivées de l'alpha-alanine ont un effet plutôt défavorable en ce qui concerne la vitesse de fermentation et le poids de levure récoltée. En ce qui concerne l'assimilation de l'azote, leur influence a tendance à être là aussi défavorable.

La production d'alcool éthylique subit des variations non significatives ; celles des produits secondaires ne montrent que des variations de faibles amplitudes.

C — MÉLANOÏDINES DE GLUCOSE ET D'ASPARAGINE

L'asparagine étant trop peu soluble pour que l'on puisse en préparer des solutions 2 M, on a pesé la quantité correspondante à 10 millimolécules et on lui a ajouté 10 cc d'une solution 1 M de glucose. Les concentrations ne sont donc pas exactement moléculaires elles sont du moins initialement identiques pour toutes les préparations.

1° Composition

TABLEAU 17

	Mélanoïdines de :					
	0	8	16	24	36	48 h
Glucose	0,40	0,39	0,37	0,35	0,28	0,24
N _A ⁰	0,40	0,24	0,20	0,16	0,14	0,14
N _M ⁰ + Ad	0	0,16	0,20	0,24	0,26	0,26

En raison de la présence de la fonction amide, il n'a pas été possible de calculer de la même façon que précédemment l'azote des mélanoïdines ; c'est l'ensemble « Azote des mélanoïdines — Azote amidé » (N_M + Ad) qui figure dans ce tableau.

2° Résultats de la fermentation

a) Gaz carbonique dégagé en fonction du temps.

TABLEAU 18

Temps de fermentation	Mélanoidines de :					
	0	8	16	24	36	48 h.
1 heure	20	22	21	23	24	25
2 heures	46	49	47	53	53	54
4 heures	122	125	130	140	144	147
6 heures	234	238	254	274	279	285
21 heures	356	356	366	376	388	386
22 heures	390	390	392	398	398	396
23 heures	390	390	392	398	398	396

Dès les premières heures de la fermentation, on observe un accroissement important de la vitesse de fermentation, d'autant plus marqué que le temps de préparation est plus long.

b) Levure formée.

TABLEAU 19

	Mélanoidines de :					
	0	8	16	24	36	48 h.
Poids récolté en mg. .	353	359	350	355	336	336
Accroissement p. 100.	121	124	118	122	110	110

Légère influence dépressive des mélanoidines de longue durée de préparation.

c) Évolution des trois formes d'azote.

TABLEAU 20

	Mélanoidines de :					
	0	8	16	24	36	48 h.
N_T N_T^O	0,80	0,64	0,64	0,62	0,66	0,64
N_T N_T^R	0,46	0,34	0,36	0,34	0,36	0,46
ΔN_T	0,34	0,30	0,28	0,28	0,30	0,28
N_A N_A^O	0,40	0,24	0,20	0,16	0,14	0,14
N_A N_A^R	0,13	0,12	0,09	0,07	0,06	0,07
ΔN_A	0,17	0,12	0,11	0,09	0,07	0,07
N_{M+A_d} $N_{M+A_d}^O$	0,40	0,40	0,44	0,46	0,52	0,50
N_{M+A_d} $N_{M+A_d}^R$	0,23	0,22	0,27	0,27	0,30	0,29
ΔN_{M+A_d}	0,17	0,18	0,17	0,19	0,22	0,21

Alors que l'azote total consommé ou la somme $N_M + N_{A_d}$ reste à peu près constante, la quantité d'azote aminé utilisé en cours de fermentation diminue sensiblement avec le temps de réaction.

d) *Alcools.*

TABLEAU 21

	Mélanoidines de :					
	0	8	16	24	36	48 h.
Éthanol	196	178	173	168	159	154
Propanols.....	0	0	0	0	0	0
Butanols.....	12	7,2	8	8,4	14,4	11

La production d'éthanol est nettement affectée par la présence des mélanoidines.

e) *Acides.*

TABLEAU 22

	Mélanoidines de :					
	0	8	16	24	36	48 h.
Résiduels	7	6	9	8	7	7
Préformés.....	0	5	5	5	6	6
Différence.....	7	1	4	3	1	1

f) *Glycérol, 2-3 Butanediol, Acétoïne.*

TABLEAU 23

	Mélanoidines de :					
	0	8	16	24	36	48 h.
Glycérol	11,2	8,7	10,8	12,3	12,8	11
2-3 Bo ¹	0,5	0,7	0,6	0,8	0,8	0,9
Acétoïne	0,03	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02

g) *Diacétyle, Acétone.*

TABLEAU 24

		Mélanoidines de				
		8	16	24	36	48 h.
Diacétyle	Préformé	0,05	0,20	0,27	0,41	0,50
	Résiduel	0,05	0,20	0,27	0,41	0,50
	Différence	0	0	0	0	0
Acétone	Préformée	0,11	0,14	0,17	0,21	0,24
	Résiduelle	0,07	0,09	0,16	0,20	0,24
	Différence	— 0,04	— 0,05	— 0,01	— 0,01	0

Résumé.

On note là aussi un effet accélérateur très net sur le dégagement gazeux. Par contre, la quantité d'éthanol formée est sensiblement diminuée, de même que le poids de levure récolté.

Aucune influence n'est observable sur les produits secondaires de la fermentation : glycérol, 2-3 Butanediol et Acétoïne, sauf peut être une légère augmentation de la quantité de 2-3 butanediol.

D — MÉLANOÏDINES DE GLUCOSE ET GLUTAMATE DE SODIUM

Ces mélanoïdines ont été préparées selon la technique habituelle, par mélange à volumes égaux de solutions 2 M.

1° Composition

TABLEAU 25

	Mélanoïdines de			
	0	8	24	48 h.
Glucose	0,40	0,33	0,24	0,21
N _A ^o	0,40	0,14	0,11	0,07
N _M ^o	0	0,26	0,29	0,33

En raison de l'alcalinité initiale du milieu de réaction, la dégradation de l'acide est beaucoup plus rapide que dans les cas précédents.

2° Résultats de la fermentation

a) Gaz carbonique dégagé en fonction du temps.

TABLEAU 26

	Mélanoïdines de			
	0	8	24	48 h.
1 heure	20	28	32	28
2 —	40	49	48	48
3 —	60	70	72	71
4 —	88	96	99	100
5 —	131	138	141	135
7 —	228	235	242	213
23,5 —	348	345	348	324
24 —	370	360	370	346
25 —	373	370	372	369
26 —	373	372	372	372

Selon le temps de préparation, on observe des effets opposés : toutes les mélanoidines accélèrent le processus, dans son début, mais, alors que les préparations de 8 heures et surtout de 24 heures, continuent d'avoir un effet favorable, celle de 48 heures inhibe manifestement de façon partielle le dégagement du gaz carbonique dans la suite de la fermentation.

b) *Levure formée.*

TABLEAU 27

	Mélanoidines de			
	0	8	24	48 h.
Poids récolté en mg.	300	287	285	280
Accroissement p. 100.	87,5	79	78	75

On remarque une inhibition faible de la croissance de la levure.

c) *Évolution des trois formes d'azote.*

TABLEAU 28

	Mélanoidines de			
	0	8	24	48 h.
N_T N_T^O	0,39	0,37	0,37	0,37
N_T N_T^R	0,16	0,18	0,24	0,24
ΔN_T	0,23	0,19	0,13	0,08
N_A N_A^O	0,39	0,14	0,10	0,07
N_A N_A^R	0,16	0	0	0
ΔN_A	0,23	0,14	0,10	0,07
N_M N_M^O	0	0,23	0,27	0,31
N_M N_M^R	0	0,18	0,24	0,28
ΔN_M	0	0,05	0,03	0,02

On constate à nouveau la bonne assimilation de l'azote aminé sous forme d'acide glutamique ; l'azote dégradé étant initialement important, on peut constater ici que l'ensemble de ces formes azotées est très mal utilisé par la levure.

d) *Alcools.*

TABLEAU 29

	Mélanoidines de :			
	0	8	24	48 h.
Ethanol	146	146	149	149
Propanols	6,7	6,7	6,8	6,8
Butanols	7,2	7,8	1,2	7,8

Il est manifeste que ces mélanœïdines n'ont aucune influence sur le rendement en alcools éthylique ou propylique ; par contre, la production de butanol tend à diminuer.

e) *Acides.*

TABLEAU 30

	Mélanœïdines de :			
	0	8	24	48 h.
Résiduels	7	8	7	6
Préformés	0	4	5	6
Différence	7	4	2	0

f) *Glycérol, 2-3 Butanediol, Acétoïne.*

TABLEAU 31

	Mélanœïdines de :			
	0	8	24	48 h.
Glycérol	13,8	13,2	9,7	11,1
2-3 Butanediol	0,5	0,8	1	1,3
Acétoïne	0,06	0,01	0,05	0,06

On remarque une augmentation progressive du 2-3 butanediol, importante en valeur relative, avec le temps de réaction. Là encore, l'acétoïne n'est trouvée qu'en quantité si faible que ses variations ne sont guère significatives.

g) *Diacétyle, Acétone.*

TABLEAU 32

		Mélanœïdines de :		
		8	24	48 h.
Diacétyle	Résiduel	0,19	0,28	0,31
	Préformé	0,18	0,29	0,30
	Différence	0,01	-0,01	0,01
Acétone	Résiduelle	0,14	0,19	0,20
	Préformée	0,12	0,13	0,17
	Différence	0,02	0,06	0,03

Là encore, on n'observe aucune production de diacétyle ; quant à l'acétone, les quantités apparemment formées restent très faibles.

En résumé.

Les faits principaux observés sont les suivants :

- La vitesse de dégagement du gaz carbonique est manifestement en relation avec le degré auquel la réaction de MAILLARD a été poussée.
- Le développement de la levure est quelque peu ralenti.
- La production d'éthanol n'est pas affectée par la présence de ces mélanoidines.

E — DISCUSSION

De cette exploration forcément superficielle et incomplète plusieurs conclusions se dégagent :

1° Le fait, semble-t-il le plus important, au moins quantitativement, est l'action des mélanoidines sur le dégagement du gaz carbonique.

Dans tous les cas, le volume total recueilli dans une fermentation en présence de mélanoidines est, à la précision des mesures près, égal au volume recueilli dans la fermentation témoin. Il semble donc que les mélanoidines ne puissent pas apporter des substrats de décarboxylation et que la seule source importante de CO_2 reste l'acide pyruvique.

Mais, par contre, et de façon presque générale, on voit que les mélanoidines influent sur la vitesse de libération de l'anhydride carbonique. Les modalités de cette action varient : c'est le plus souvent un effet accélérateur, mais on a noté également une action modératrice. La nature des mélanoidines mises en jeu intervient ; il semble également que cette action puisse dépendre de la phase de fermentation : les mélanoidines de glutamate de sodium 48 h développent un effet accélérateur dans les 4 premières heures de fermentation, puis ont une influence retardatrice sur le dégagement de CO_2 . Il apparaît donc que cette action peut être diverse et que différents constituants du mélange complexe que sont les mélanoidines puissent intervenir comme activateurs ou inhibiteurs.

2° L'influence des mélanoidines s'affirme également lorsque l'on examine les rendements en levure. Tantôt leur présence est très nettement favorable (mélanoidines de glycocolle), tantôt on a affaire à une inhibition qui se manifeste soit dès le début de la réaction de MAILLARD (glutamate de sodium), soit seulement après un certain temps de chauffage. Ce qui peut d'ailleurs s'expliquer par le fait que, la réactivité du glutamate de sodium étant très grande, il se forme rapidement des composés actifs qui, dans les autres cas, n'apparaissent qu'après un temps plus long.

3° En ce qui concerne l'assimilation azotée, il apparaît que l'azote appelé ici dégradé ou azote des mélanoidines est une source encore plus mauvaise que l'acide aminé initial ; dans tous les cas, les quantités absolues d'azote dégradé disparues du milieu au cours de la fermentation sont inférieures aux quantités d'azote aminé consommées. Un seul essai semble faire exception : celui de l'asparagine ; en réalité, l'azote dit « des mélanoidines » comprend l'azote amidé, excellente source azotée pour la levure.

Le cas le plus démonstratif est celui de la mélanoidine de glutamate de sodium : la réaction de MAILLARD aboutit alors à la formation d'une proportion importante d'azote dégradé. Les conditions du dosage par différence sont alors améliorées et il

serait facile de voir avec assez de précision une disparition éventuelle de ces formes azotées. Or, les ΔN_M restent très voisins du zéro.

Dans deux circonstances — mélanoidines d'alpha-alanine et, de façon moins démonstrative, d'asparagine — il apparaît même que la présence des mélanoidines dans le milieu de fermentation abaisse les possibilités d'utilisation par la levure de l'azote aminé lui-même ; alors que 0,17 milli-atomes d'azote provenant de l'alpha-alanine sont consommés par la levure dans l'essai témoin, cette valeur tombe en moyenne, à 0,1 en présence de mélanoidines du même aminoacide.

4° En général, la production globale d'éthanol n'est pas affectée sensiblement par la présence des mélanoidines, sauf toutefois dans le cas de la mélanoidine d'asparagine où l'on observe une diminution notable et progressive (de 196 à 154 micromoles par cc) lorsqu'augmente le temps de chauffage de la préparation étudiée.

Quant aux autres alcools, appelés ici globalement propanols et butanols, il ne paraît pas que leur production soit nettement modifiée dans ces conditions ; des techniques de séparation et de dosage plus fines que celles utilisées ici devraient être mises en œuvre pour l'établir ou l'infirmier.

5° L'acidité dosable après extraction à l'éther après fermentation reste de même à peu près constante. Mais, si l'on défalque l'acidité initiale, on observe pour l'acidité produite en cours de fermentation, une décroissance générale en fonction du temps de chauffage des mélanoidines et ceci quel que soit l'acide mis en jeu. Il serait donc nécessaire d'identifier les acides préformés apportés par la mélanoidine et les acides de fermentation ; il est possible que les premiers soient consommés par la levure ; dans ce cas, il ne serait pas légitime de les défalquer de l'acidité finale.

6° Quant aux autres produits secondaires de la fermentation dont l'évolution a été examinée, ils ne subissent que des fluctuations de peu d'amplitude sous l'influence des mélanoidines.

Il en est de même des deux composés carbonylés apportés par les mélanoidines : diacétyle et acétone. Pour le premier, le bilan de la formation est constamment nul ; pour le second le bilan est en général très légèrement positif ; mais les quantités ainsi calculées restent toujours du même ordre de grandeur que les erreurs d'expérience et de calcul. Seul le fait que ces bilans sont systématiquement légèrement positifs, pourrait conduire à penser que de très faibles quantités, sinon d'acétone, du moins de composés interférant avec cette méthode de dosage, peuvent s'accumuler dans le milieu de fermentation.

Il est d'ailleurs possible que si les productions globales de certains composés ne sont pas affectées par des mélanoidines, leurs évolutions en cours de fermentation le soient comme l'est précisément celle de l'anhydride carbonique.

ÉTUDE PARTICULIÈRE DU DÉGAGEMENT DE CO_2 .

Dans cette seconde partie du travail, nous nous sommes efforcés de préciser les caractères de l'effet accélérateur de la décarboxylation observé avec certaines mélanoidines glucose-glycocolle 24 ou 36 heures, qui développent cet effet avec une netteté suffisante.

Nous avons d'abord cherché à préciser les limites de concentration où cette influence se manifestait et l'évolution de cette action au cours de la fermentation ; un phénomène plus complexe qu'une simple activation ayant été mis en évidence,

nous avons entrepris la séparation des différentes substances actives et leur isolement grossier à partir de la mélanoidine.

1° Influence de la concentration sur l'activité des mélanoidines

Les mélanoidines de glucose et de glycolle ont été diluées à l'eau distillée et des fermentations ont été effectuées en présence de ces dilutions dans les conditions décrites précédemment.

Une série d'essais préliminaires avec des mélanoidines de 16 h, 24 h, et 36 h a donné, après un temps de fermentation de 20 h, les résultats suivants :

TABLEAU 33

Mélanoidines de	Dilutions						Témoins
	1	5	25	125	625	3125	
16 heures	264	240	235				235 cc
24 heures		240	257	253			235
36 heures	356	356	356	356	356	356	341

On voit que la dilution peut avoir des effets divers et même opposés sur l'allure de la fermentation : lorsque la dilution augmente, l'activation décroît dans le cas de la mélanoidine de 16 heures, augmente dans le cas de celle de 24 heures, reste constante pour la préparation de 36 heures.

Ces phénomènes ont été examinés de plus près au micro-Warburg sur trois préparations : de 7 h., de 24 h., 36 heures respectivement, les essais ayant été conduits de la façon suivante :

On introduit dans la fiole à fermentation :

— 1 cc du mélange de :

solution A	2,5 cc.	} ajusté à 25 cc.
solution B	7,5 cc.	
thiamine 20 γ /cc	0,5 cc.	

— 1 cc de suspension de levure apportant 0,8 mg de substance sèche.

On place dans le diverticule de cette fiole :

0,5 cc de la solution en expérience.

Après avoir chassé l'air par passage d'azote et après mise en équilibre de température à 30° C, on mélange le contenu du diverticule et celui de la fiole. On lit alors, toutes les dix minutes, pendant une heure, les pressions développées à volume constant selon la méthode classique et on calcule les volumes de gaz carbonique dégagé. Traçant la courbe de ces volumes recueillis en fonction du temps, on calcule sa pente, c'est-à-dire, la vitesse de dégagement du gaz carbonique, que l'on exprime en microlitres par minute. On rapporte ces vitesses à celles du témoin V_T prise ainsi comme unité. On obtient ainsi des rapports $\frac{V}{V_T}$ supérieurs à 1 dans le cas d'une activation des décarboxylations, inférieurs à 1 dans le cas d'une inhibition. Enfin, on trace la

courbe représentant les variations de $\frac{V}{V_T}$ en fonction du logarithme de la dilution. L'abscisse 0 correspond à une fermentation en présence de la mélanoidine à la concentration initiale ($d = 1$) ; la valeur du témoin ($d = \infty$) est atteinte asymptotiquement. Le tableau 34 et les courbes I représentent les résultats obtenus.

TABLEAU 34

Valeurs de $\frac{V}{V_T}$ en fonction de la dilution de la mélanoidine.

Temps de préparation	Dilutions						
	1	10	100	1 000	5 000	10 000	∞
7 heures	1,03	1,06	1,09	1,23	1,06	1	1
24 heures	1,07	1,11	1,15	1,33	1,04	1	1
36 heures	1,03	1,05	1,20	0,83	0,92	0,96	1

Les trois courbes représentent un maximum net, correspondant à un accroissement de la vitesse de dégagement du gaz carbonique de 25 p. 100 pour les préparations de 7 h et 36 heures, et de 33 p. 100 pour la préparation de 24 heures ; ces maxima sont d'ailleurs atteints pour les valeurs très différentes de la dilution : environ 1 400 pour les mélanoidines de 7 et 24 heures, 140 seulement pour la mélanoidine de 36 heures. Cette dernière diffère également des deux autres en ce que ce maximum est suivi d'un minimum situé dans une zone de dilution de 1 400 à 1 500.

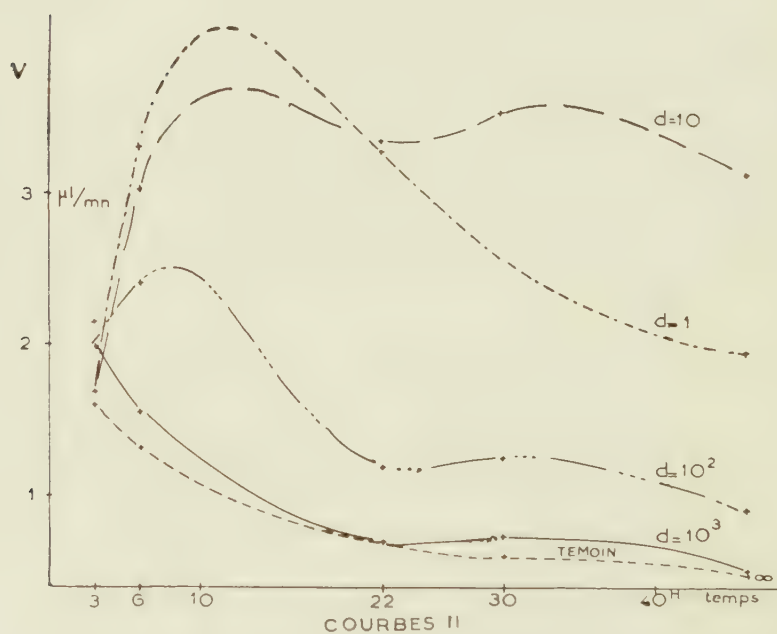
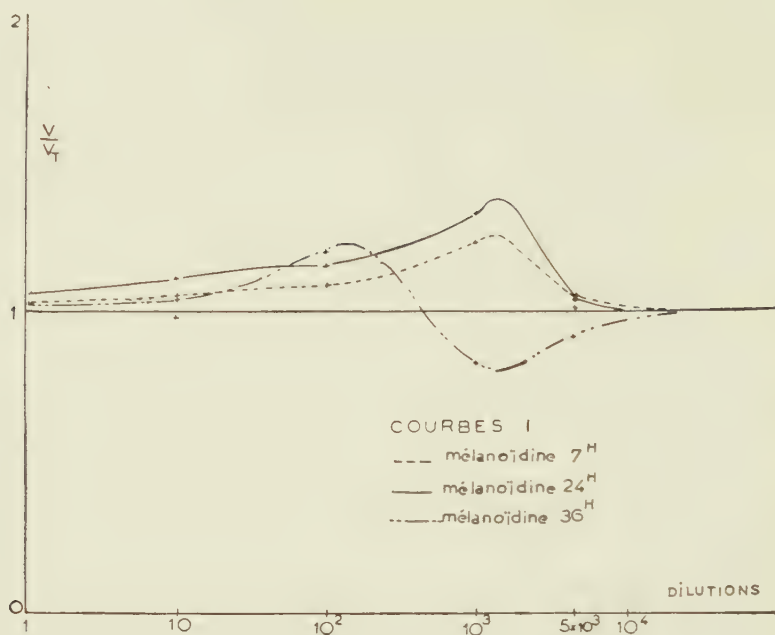
Ces essais ont été effectués avec des milieux de culture déficients en alimentation azotée, du fait que les seules sources de N sont le glyocolle et ses produits de dégradation ; il était intéressant de voir ce qu'il adviendrait des résultats obtenus lorsque la levure fermenterait en milieu contenant une forme d'azote facilement assimilable. Dans ce but, les phosphates mono et bipotassiques utilisés pour la préparation de la solution A ont été remplacés par des quantités équimoléculaires de phosphates mono et bi-ammoniques. Le tableau 35 expose les résultats obtenus avec la mélanoidine de 24 heures.

TABLEAU 35

Valeurs de $\frac{V}{V_T}$ en milieu complet.

d	1	100	1 000	5 000	10 000	∞
$\frac{V}{V_T}$	0,86	1,10	1,14	1	1	1

On voit que le phénomène conserve la même allure générale mais avec une amplitude beaucoup moindre, l'accélération maximum obtenue alors n'étant que de l'ordre de 15 p. 100.



2° Influence du temps de fermentation sur l'activité de la mélanoidine

Au cours des essais ci-dessus, différentes observations avaient été faites qui permettaient de penser que l'action des mélanoidines pouvait ne pas rester constante au cours de la fermentation. Cette question a donc été examinée de façon systématique.

Les essais devant se prolonger sur une période assez longue, les quantités de glucose initialement présentes ont été ajustées à la même valeur ; dans ce but, après avoir dosé le glucose dans la mélanoidine, on fait toutes les dilutions avec une solution pure à cette concentration, soit 4. p. 100, dans le cas étudié ; le témoin ($d = \infty$) reçoit lui-même 0,5 cc de cette solution.

TABLEAU 36
Vitesse de dégagement de CO_2 (en $\mu l/min.$)

Temps de fermentation	Dilutions						
	1	10	100	1 000	5 000	10 000	∞
3 heures	1,66	1,68	1,98	2,15	1,73	1,66	1,60
6 heures	3,31	3,02	2,40	1,55	0,31	1,32	1,31
22 heures	3,27	3,35	1,18	0,69	0,70	0,70	0,70
30 heures	2,57	3,53	1,25	0,73	0,73	0,68	0,60
46 heures	1,94	3,13	0,90	0,50	0,47	0,53	0,48

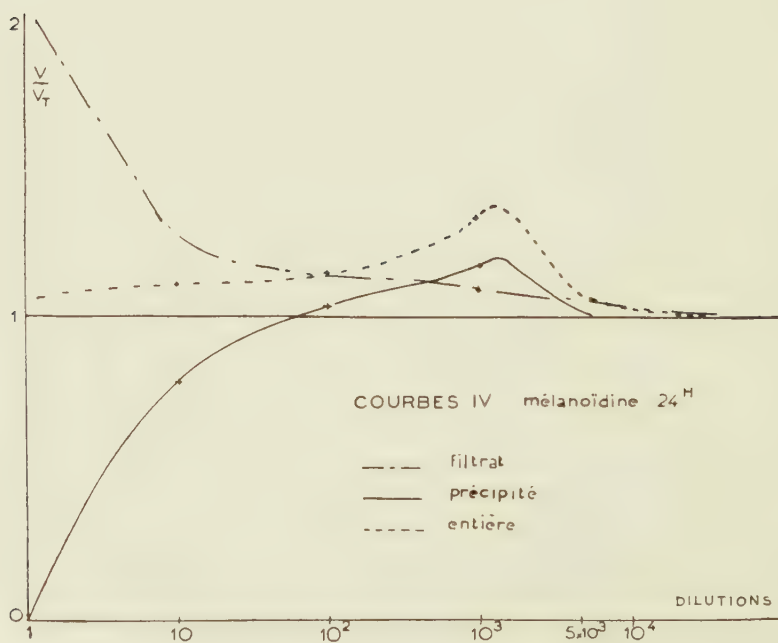
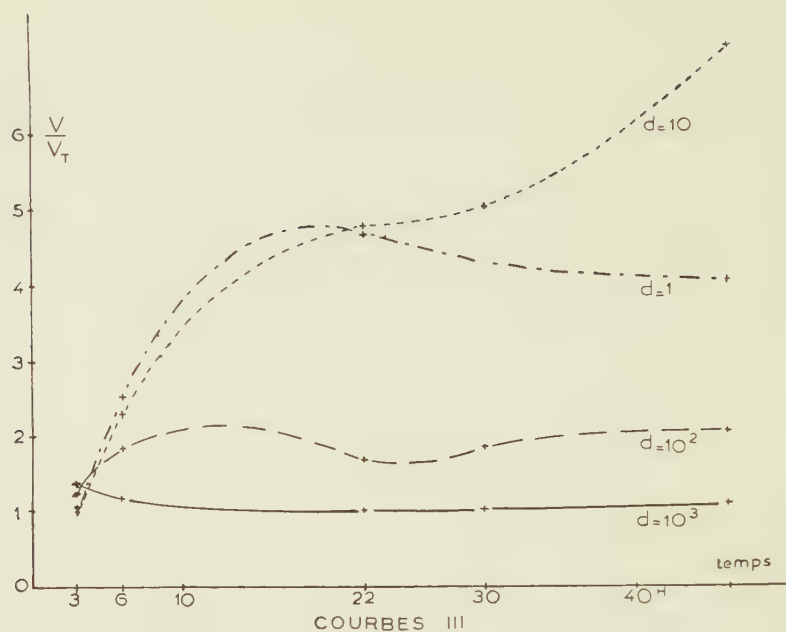
TABLEAU 37

Rapports $\frac{V}{V_T}$

Temps de fermentation	Dilutions						
	1	10	100	1 000	5 000	10 000	∞
3 heures	1,04	1,05	1,24	1,34	1,08	1,04	1
6 heures	2,52	2,30	1,83	1,18	1	1	1
22 heures	4,66	4,78	1,68	1	1	1	1
30 heures	4,30	5,03	1,87	1,09	1,03	1	1
46 heures	4,05	7,14	2,04	1,13	1,04	1	1

Le tableau 36 et les courbes II montrent l'évolution des vitesses de dégagement du gaz carbonique en fonction du temps de fermentation pour différentes valeurs de la dilution de la mélanoidine. D'une part, on retrouve, pour les faibles dilutions ($d < 100$), à tous les stades de la fermentation, l'action accélératrice notée précédemment au seul temps de 3 heures ; par contre, aux fortes dilutions, cette influence ne se maintient pas au cours du temps et la vitesse de dégagement tombe plus ou moins rapidement à la valeur de celle du témoin.

D'autre part, alors qu'aux faibles concentrations, la vitesse ne fait que décroître dans l'intervalle de temps examiné, aux plus fortes concentrations cette vitesse



passé par un maximum; on constate d'ailleurs, que l'action est optimum pour la dilution 10, en ce sens que, à cette concentration, l'influence accélératrice se maintient plus longtemps qu'aux dilutions 1 et 100.

Le tableau 37 et les courbes III exposent les mêmes résultats exprimés en prenant comme unité la vitesse de fermentation du témoin au même instant; l'action particulière de la dilution 10 y apparaît encore plus nettement.

3° Fractionnement des mélanoidines et localisation de l'activité

Les résultats obtenus ci-dessus peuvent s'expliquer par la présence dans les mélanoidines d'activateurs et d'inhibiteurs dont les variations d'activité en fonction de la dilution ne suivraient pas les mêmes lois. Qualitativement, cette hypothèse rend compte de l'existence du maximum des courbes I. Pour justifier les courbes II, il faut de plus admettre que ces deux types d'effecteurs sont détruits à des vitesses différentes au cours de la fermentation, C'est pour étayer cette hypothèse de l'existence simultanée d'activateur et d'inhibiteurs que le fractionnement des mélanoidines a été entrepris.

A — Extraction aux solvants.

Deux solvants ont été employés : l'éther et l'acétate d'éthyle. Dans les deux cas, le mode opératoire a été le même. Vingt centimètres cubes de mélanoidines sont extraits en continu pendant 24 heures; le solvant est ensuite éliminé complètement par distillation sous-vide à basse température et l'extrait sec est repris par 20 cc d'eau; la mélanoidine résiduelle est de même débarrassée des traces de solvant qu'elle contient par distillation sous pression réduite et son volume est complété à 40 cc. On traite de la même façon 20 cc d'eau distillée : l'extrait et le résidu d'extraction seront utilisés pour faire des essais témoins de fermentation destinés à mettre en évidence l'influence éventuelle de traces de solvant non éliminées.

Le tableau 38 rassemble les résultats obtenus.

TABLEAU 38
Volumes de CO₂ recueillis (en cc)

Solvants	Témoin	Mélanoidine entière	Extraits	Extrait témoin	Résidu
Ether	177	207	49	50	202
Acétate d'éthyle	322	340	335	321	338

On voit que l'extraction étherée laisse dans le résidu la totalité de l'activité de la préparation. Or, ce résidu est à peu près aussi complexe que la mélanoidine entière dont une très faible partie seulement est éthero-soluble. Par ailleurs, les extraits étherés inhibent complètement la fermentation.

L'acétate d'éthyle n'apporte pas non plus de résultats intéressants, l'activité de l'extrait étant égale à celle du résidu d'extraction.

B — *Chromatographie* :

— *Sur résine échangeuse de cations.* On a utilisé la colonne et la technique décrites précédemment dans la partie analytique de cet exposé. Les différentes fractions de 15 cc obtenues par rinçage à l'eau de la colonne de D 50, initialement chargée de 5 cc de mélanoidine, sont éprouvées au fermentomètre et on obtient les résultats suivants :

TABLEAU 39
Numéro des fractions :

	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Témoin
CO ₂ recueilli . . .	294	302	298	299	308	301	290	288	287	286

On constate que l'activité, maximum dans la fraction 8, se trouve étalée cependant sur une plage assez importante ; la fraction 8 ne contient ni glucose ni pigments ; par contre, en 4, 5 et 6 l'effluent contient le glucose apporté par la prise d'essai et quelques pigments.

— *Sur colonne de célite.* — On a utilisé une colonne de 8 g de célite 535 lavée à l'acide chlorhydrique concentré par macération de 15 heures puis, à l'eau distillée jusqu'à neutralité ; enfin, séchée à l'air libre, puis à 150° C.

5 cc de mélanoidine sont versés sur cette colonne qui est ensuite lavée par 50 cc d'eau, ces deux solvants étant recueillis séparément. Après évaporation du solvant et reprise dans l'eau distillée, on teste l'activité au fermentomètre :

TABLEAU 40

	Fractions		Témoin	Mélanoidine entière
	Méthanolique	Aqueuse		
CO ₂ dégagé en cc.	309	288	287	308

On trouve toute l'activité dans la fraction alcoolique qui, par ailleurs, ne contient que de faibles quantités de glycolle, de glucose et de pigments.

C — *Par précipitation.* — Ces derniers résultats nous ont conduits à tenter un fractionnement par précipitation des pigments en milieu alcoolique et acide : à 10 cc de mélanoidine, on ajoute 1 cc d'acide acétique cristallisable et 100 cc de méthanol. Après repos de 2 heures au froid, on filtre. On obtient ainsi un filtrat alcoolique et un précipité que l'on dissout sur le filtre par lavage à la soude N 50 ; cette solution fortement colorée est neutralisée par l'acide acétique et son volume ajusté à 20 cc. Le méthanol du filtrat est éliminé par distillation sous-vide et le volume ajusté également à 20 cc. Les deux solutions ainsi obtenues, filtrat et précipité, sont testées au micro-Warburg en fonction de leur dilution.

Les résultats obtenus avec des mélanoidines de 24 et de 36 heures, sont rassem-

blés dans le tableau 41 et les courbes IV où les valeurs $\frac{V}{V_T}$ sont données en fonction de la dilution.

TABLEAU 41

Mélanoidines	Dilutions							
	1	5	10	100	1 000	5 000	10 000	∞
Entière	1,07		1,10	1,14	1,33	1,06	1,03	1
24 h. Filtrat		1,65	1,22	1,15	1,10	1,06	1,03	1
Précipité		0	0,79	1,04	1,16	1	1	1
Entière	1		1,03	1,19	0,93	0,99	0,98	1
36 h. Filtrat	1,95		1,82	1,22	0,76	0,97	1	1
Précipité	0		0,16	1,22	1,13	1	1	1

On constate que les pourcentages d'accroissement d'activité calculés pour le filtrat et le précipité, sont additifs et que leur somme est sensiblement égale à la valeur trouvée directement pour la mélanoidine entière :

$$\frac{V - V_T}{V_T} = \frac{V_T}{V} - 1$$

$$\left[\frac{V - V_T}{V_T} \right]_F + \left[\frac{V - V_T}{V_T} \right]_P \simeq \left[\frac{V - V_T}{V_T} \right]_M$$

ou :

$$\left[\frac{V}{V_T} \right]_F + \left[\frac{V}{V_T} \right]_P - 1 \simeq \left[\frac{V}{V_T} \right]_M.$$

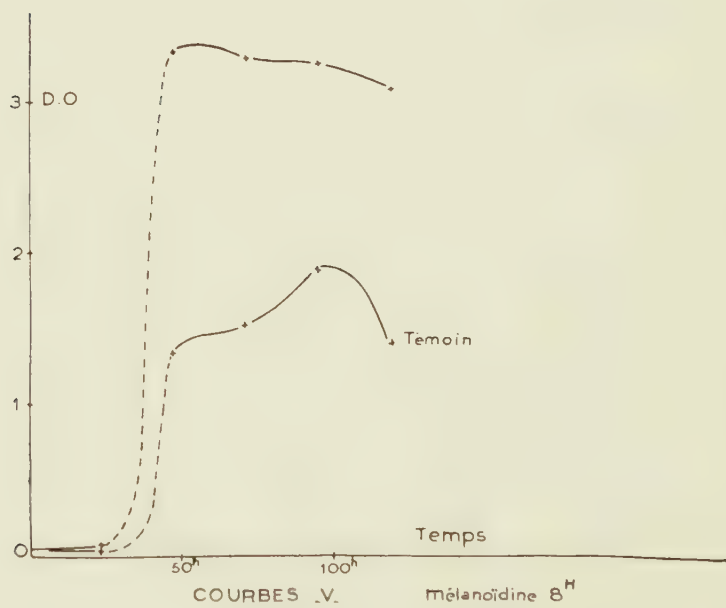
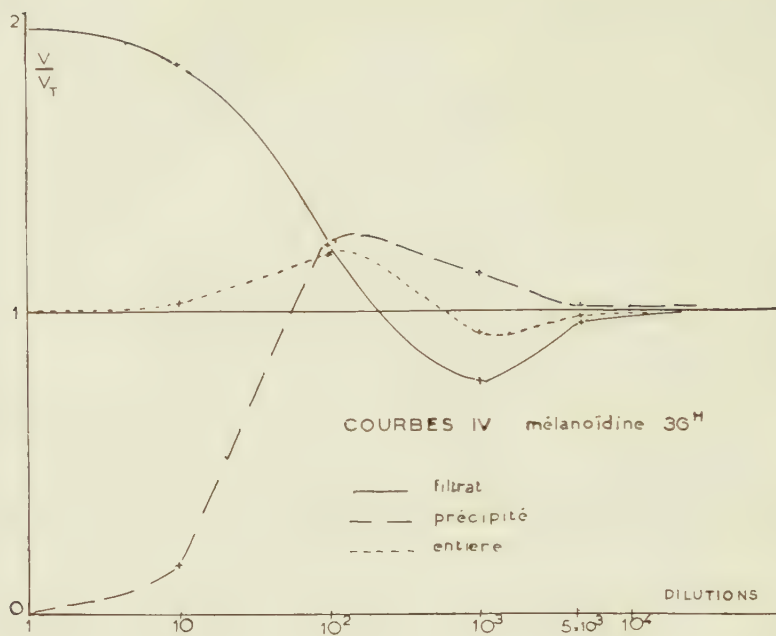
Le tableau 42 montre les résultats obtenus :

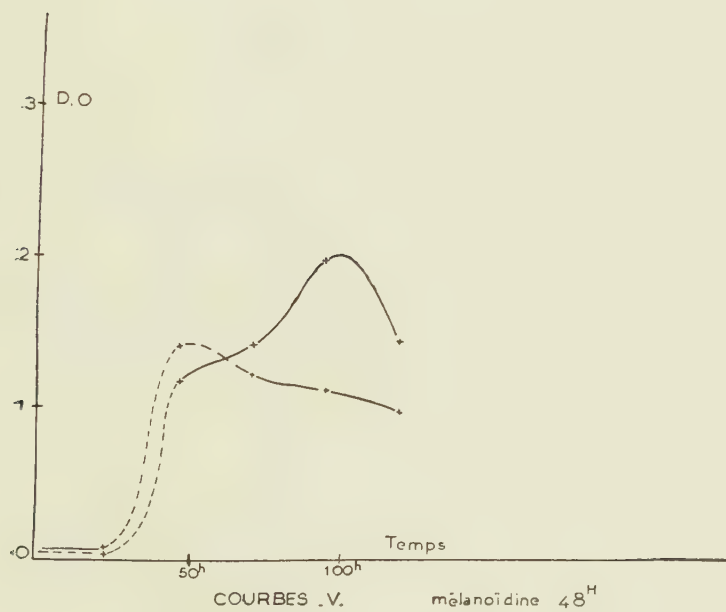
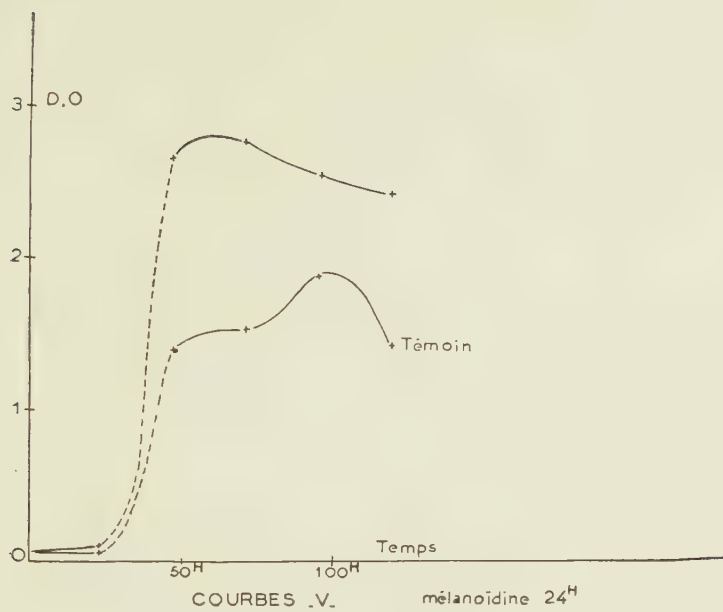
TABLEAU 42

Mélanoidine	d	$\left[\frac{V}{V_T} \right]_F$	$\left[\frac{V}{V_T} \right]_P$	$\Sigma - 1$	$\left[\frac{V}{V_T} \right]_M$
24 heures	5	1,65	0	0,65	1,10
	10	1,22	0,79	1,01	1,11
	100	1,15	1,04	1,19	1,19
	1 000	1,10	1,16	1,26	1,33
	5 000	1,06	1	1,06	1,06
	10 000	1,03	1	1,03	1,03
36 heures	1	1,95	0	0,95	1
	10	1,82	0,16	0,98	1,03
	100	1,22	1,22	1,44	1,19
	1 000	1,13	0,76	0,89	0,93
	5 000	1	0,97	0,97	0,99
	10 000	1	1	1	0,98

Sauf dans deux cas relatifs aux dilutions 5 et 100 des mélanoidines 24 et 36 heures respectivement, la relation d'additivité est assez bien établie.

Etant donné notre manque actuel de connaissance sur le mécanisme de l'acti-





vation enzymatique, il est difficile de prévoir quelle devrait être la relation théorique ; il semble cependant que les pourcentages d'activation et d'inhibition devraient être multiplicatifs, si chaque effecteur exerçait son action de façon indépendante. Tel n'est certainement pas le cas. Si l'activateur en question a donc au moins partiellement un rôle anti-inhibiteur dans la préparation entière, il possède certainement une action propre sur le système enzymatique lui-même, du fait qu'en l'absence d'inhibiteur il accélère notablement le dégagement du gaz carbonique.

Conclusions

A la suite de ces essais, il ressort que les mélanoidines de glucose et de glycolle contiennent à la fois des activateurs et des inhibiteurs des systèmes enzymatiques aboutissant au dégagement de gaz carbonique par fermentation. La résultante de ces deux actions opposées dépend :

- du degré plus ou moins poussé de la réaction de MAILLARD.
- de la dilution de la mélanoidine.
- du stade atteint par la fermentation.
- enfin, de la composition du milieu de fermentation ; en milieu privé d'azote facilement assimilable, c'est en général, l'effet activateur qui l'emporte.

Activateurs et inhibiteurs ont pu être approximativement séparés par addition de méthanol à la mélanoidine, en milieu acide : la plus grande partie des activateurs reste en solution dans ces conditions alors que la majorité des inhibiteurs se trouve précipités.

DEUXIÈME PARTIE

CULTURE EN AÉROBIOSE

On a constaté précédemment que la présence de mélanoidines dans le milieu de fermentation pouvait affecter, dans un sens ou dans l'autre, le poids de levure formé au cours de cette opération. Nous nous sommes attachés ensuite à définir cette influence dans le cas de la culture en aérobiose.

Les milieux de culture, les appareils et le mode opératoire ont été décrits, dans leurs grandes lignes, dans la partie analytique de cet exposé ; nous rappellerons que la solution B ne contient pas de glucose, nous appelons B' cette nouvelle solution. Dans ces conditions, les milieux de culture sont ainsi constitués.

Tous contiennent :

Solution A.....	5 cc.
Solution B'.....	15 cc.
Solution de thiamine.....	20 cc.
Suspension de Levure.....	2 cc. soit 10 mg de levure sèche.

Les milieux témoins reçoivent :

Glucose 0,4 M.....	8,3 cc. soit 598 mg
Glycolle 0,4 M.....	10 cc.

Les milieux en expérience reçoivent :

Mélanoidine.....	10 cc.
Glucose 0,4 M.....	une quantité telle que la teneur totale en glucose soit de 598 mg.

Le volume total est amené à 100 cc.

Les cultures sont maintenues à 28° C avec insufflation d'air divisé au débit approximatif de 200 cc par minute.

On suit le développement de la levure en effectuant des prélèvements de 5 cc aux temps convenables. Cette prise d'essai est centrifugé et le culot de levure est lavé complètement, puis, mis en suspension dans 5 cc d'une solution de carbonate de soude à 0,1 p. 100. On mesure la turbidité à 550 m μ .

Les essais ont été conduits en double, mais non simultanément.

Les résultats obtenus avec des mélanoidines de glucose-glycocolle de 8 h, 24 h et 48 heures sont rassemblés dans les tableaux suivants, et illustrés par les courbes.

TABLEAU 43

Mélanoidine glucose-glycocolle 8 h.

Temps de culture	Témoins			Essais avec mélanoidine		
	1	2	Moyenne	1	2	Moyenne
23 h	46	42	44	63	62	61
46 h	1 360	1 355	1 350	3 340	3 365	3 353
71 h	1 560	1 530	1 445	3 300	3 293	3 296
95 h	1 960	1 899	1 925	3 250	3 228	3 239
119 h	1 460	1 412	1 436	3 100	3 065	3 082

TABLEAU 44

Mélanoidine glucose-glycocolle 24 h.

Temps de culture	Témoins			Essais avec mélanoidine		
	1	2	Moyenne	1	2	Moyenne
23 h	45	43	44	94	87	90
47 h	1 410	1 328	1 399	2 675	2 630	2 633
71 h	1 520	1 540	1 530	2 740	2 799	2 765
95 h	1 902	1 885	1 894	2 530	2 580	2 555
119 h	1 399	1 430	1 415	2 410	2 470	2 440

TABLEAU 45

Mélanoidine glucose-glycocolle 48 h.

Temps de culture	Témoins			Essais avec mélanoidine		
	1	2	Moyenne	1	2	Moyenne
23 h	40	42	41	75	78	77
47 h	1 152	1 205	1 177	1 360	1 409	1 385
71 h	1 399	1 460	1 430	1 192	1 205	1 199
95 h	1 980	1 970	1 975	1 091	1 103	1 097
119 h	1 410	1 420	1 415	905	970	937

Dans les trois cas, l'influence de la mélanoidine sur la multiplication de la levure dans nos conditions opératoires se manifeste de façon très nette : en présence de mélanoidine de 8 heures, le rendement en levure est pratiquement doublé ; une mélanoidine de 24 heures, augmente encore ce rendement de 70 p. 100 ; par contre, en présence de mélanoidine de 48 heures, on observe une inhibition importante, d'environ 35 p. 100.

IV. — CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Nous avons examiné le comportement de la levure en présence de différentes mélanoidines dans diverses conditions. D'une façon générale, on peut affirmer que la levure répond, de quelque façon, à la présence de mélanoidines dans le milieu où elle se développe. Mais la forme de cette réponse dépend de nombreux paramètres, dont beaucoup sont d'ailleurs à rapporter à la complexité et à la diversité des milieux rassemblés sous ce terme unique de mélanoidines.

En fermentation, le phénomène le plus général et quantitativement le plus important, est une action sur la vitesse de dégagement du gaz carbonique. Dans le cas particulier des mélanoidines de glucose et de glyocolle, il est apparu que la réaction de MAILLARD entraîne la formation de deux types opposés d'effecteurs -activateurs et inhibiteurs — dont les proportions varient avec le stade atteint par la réaction et dont la résultante dépend en particulier de la concentration à laquelle ils se trouvent finalement amenés dans le milieu de culture.

De plus, il apparaît également que, très généralement, la réaction de MAILLARD diminue plutôt les possibilités d'assimilation — déjà minimes — de l'azote aminé par la levure : non seulement l'ensemble des formes dégradées de l'azote ne sont pas utilisées elles-mêmes, mais souvent la présence des mélanoidines tend à diminuer l'assimilation de la forme aminée ; en tout cas, elle ne la favorise jamais.

Enfin, il ne semble pas que les mélanoidines affectent de façon importante le bilan général de la fermentation ; mais on ne peut exclure a priori l'hypothèse d'une action sur la cinétique des différentes productions, analogue à celle mise en évidence pour la production du gaz carbonique.

En aérobiose, dans un milieu où l'azote est apporté par le glyocolle, donc en présence d'une source azotée de mauvaise qualité, les mélanoidines se sont montrées des agents actifs, non seulement sur la vitesse de croissance, mais aussi sur le rendement en levure de la culture. Là encore, le degré auquel la réaction de MAILLARD a été poussée conditionne le sens de son influence : à la fois accélératrice de la vitesse du développement et favorable au rendement en début de réaction, celle-ci devient inhibitrice lorsque la réaction est poursuivie jusqu'à un stade plus avancé. On retrouve ici, aussi nettement qu'en fermentation, la preuve de l'existence dans les mélanoidines de deux catégories d'effecteurs d'actions opposées, activateurs et inhibiteurs de différents systèmes enzymatiques. Le fait que les activateurs sont prédominants dans les premiers stades et que les inhibiteurs l'emportent progressivement lorsque se déroule la réaction de MAILLARD, laisse penser que les premiers sont constitués par des formes moléculaires relativement simples, alors que les seconds se rapprochent des polymères terminaux.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) MAILLARD L. C., 1912. Action des acides aminés sur les sucres. Formation des mélanoidines par voie méthodique. *C.R. Ac. Sci.*, **154**, 66-68.
- (2) ENDERS C., 1938. Zur Kenntnis der Melanoidine. *Kolloid. Z.*, **85**, 74-87.
- (3) DANEHY J. P., PIGMAN W. W., 1951. — Reactions between sugars and nitrogenous compounds and their relationship to certain food problems. *Adv. Food. Res.*, **3**, 241-290.
- (4) HODGE J. E., 1953. Chemistry of browning reactions in model systems. *Agr. Food Chem.*, **1**, 928-943.
- (5) ELIIS G. P., 1950. The Maillard reaction. *Adv. Carb. Chem.*, **14**, 63-136.
- (6) CHICHESTER C. O., STADTMAN F. H.; MAC KINNEY G. On the products of the Maillard réaction. *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 3-418-3-420.
- (7) CREMER H. D., MENDEN E., 1956. Ueber nicht-enzymatische Bräunungsreaktionen und ihre physiologischen Folgen. *Zeitsch. Lebensm. Unters. Forsch.*, **104**, 33-43.
- (8) DZIERZBICKI A., 1909. Influence of humus substances upon the development of yeast and upon alcoholic fermentation. *Anz. Akad. Wissensch. Krakau*, 651-660 (d'après *Biochem. Cents.*, **9**, 704).
- (9) PETERSON R., ROSE D., LOEB L., 1949. Influence of the amino-acid-dextrose reaction on the growth of *Bacillus Polymyxa*. *Can. J. Res.*, **27** Sect C., 269-273.
- (10) ZARRODSKII A. G., TIKHOMIROVA E. I., 1958. Effects of melanoid compounds on mash microflora. *Mikrob.*, **27**, 127-130.
- (11) CHELDELIN V. H., KING T. E., 1953. Nutrition of micro-organisms. *Ann. Rev. Microb.*, **7**, 113.
- (12) SHAFFER P. A., HARTMANN A. F., 1920-21. The iodometric determination of copper and its use in sugar analysis. II. — Methods for the determination of reducing sugars in blood, wine, milk and other solutions. *J. Biol. Chem.*, **45**, 365-390.
- (13) THOMPSON J. F., ZACHARIUS P. M., STEWARD F. C., 1951. Investigations on nitrogen compounds and nitrogen metabolism in plants. I. — The reactions of nitrogen compounds with ninhydrin on paper: a quantitative procedure. *Plant Physiol.*, **26**, 275-394.
- (14) NEISH A. C., 1951. Analysis of mixtures of simple aliphatic alcohols by partition chromatography. *Can. J. Chem.*, **29**, 552-557.
- (15) WESTERFIELD W. W., 1945. A colorimetric determination of blood acetoin. *J. Biol. Chem.*, **161**, 495-502.
- (16) WHITE A. G. C., KRAMPITZ L. O., WERKMAN C. H., 1946. Method for the direct determination of diacetyl in tissue and bacterial filtrates. *Arch. Biochem.*, **9**, 229-234.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

EFFETS PHYSIOLOGIQUES DE LA STREPTOMYCINE SUR LES PLANTES VASCULAIRES.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 13 juin 1960

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PÉRÈS

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

JEAN SARRAILH

